



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

SÉRGIO EUSTÁQUIO LEMOS DA SILVA

**DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM
O VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS E
SOROPREVALÊNCIA EM AVES NÃO VACINADAS**

UBERLÂNDIA

2018

SÉRGIO EUSTÁQUIO LEMOS DA SILVA

DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM O VÍRUS DA
BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS E SOROPREVALÊNCIA EM AVES NÃO
VACINADAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina
Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia,
como exigência parcial para obtenção do título de
Doutor em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daise Aparecida Rossi

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina Cardoso

UBERLÂNDIA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- S586d
2018 Silva, Sérgio Eustáquio Lemos da, 1974
Disfunção mitocondrial de macrófagos infectados com o vírus da
bronquite infecciosa das galinhas e soroprevalência em aves não
vacinadas / Sérgio Eustáquio Lemos da Silva. - 2018.
119 p. : il.
- Orientadora: Daise Aparecida Rossi.
Coorientadora: Tereza Cristina Cardoso.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.456>
Inclui bibliografia.
1. Veterinária - Teses. 2. Ave - Doenças - Teses. 3. Macrófagos -
Teses. 4. Apoptose - Teses. I. Rossi, Daise Aparecida. II. Cardoso,
Tereza Cristina . III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

CDU: 619

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Ata da defesa de **TESE DE DOUTORADO** junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: **TESE DE DOUTORADO** Nº PPGCV/007/2018

Data: 29/03/2018

Discente: *Sérgio Eustáquio Lemos da Silva* – Matrícula – 11413MEV021

Título da Tese: **DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS E SOROPREVALÊNCIA EM AVES NÃO VACINADAS**

Área de concentração: SAÚDE ANIMAL

Linha de pesquisa: CLÍNICA MÉDICA E INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA

Projeto de Pesquisa de vinculação: EPIDEMIOLOGIA DE ZOONOSES


Aos 29 dias do mês de Março do ano de 2018 às 13:30 horas na sala 2D54 – Bloco 2D – Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Comissão Julgadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, composta pelos Professores/Doutores: **Ana Maria Bonetti** – UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA; **Belchiolina Beatriz Fonseca** – UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA; **Eliane Pereira Mendonça** – INSTITUTO FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO; **Fabiana de Almeida Araújo Santos** – FACULDADE PRESIDENTE ANTONIO CARLOS DE UBERLÂNDIA e **Daise Aparecida Rossi** orientador(a) do(a) candidato(a).


Iniciando os trabalhos o(a) presidente da comissão Dr./Dra. Daise Aparecida Rossi concedeu a palavra ao/a candidato(a) para a exposição do seu trabalho, contando com o tempo máximo de 50 minutos. A seguir o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o(a) candidato(a), durante o prazo máximo de (30) minutos, assegurando-se a mesma igual prazo para resposta. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Comissão Julgadora, em sessão secreta, considerou o(a) candidato(a) aprovado.

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme Regulamento do Programa, Legislação e a Regulamentação Interna da UFU.

Os trabalhos foram encerrados às 16 horas e 30 minutos, e para constar, lavrou-se a presente ata que será assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Uberlândia, 29 de março de 2018.


Profa. Dra. Ana Maria Bonetti
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA


Profa. Dra. Belchiolina Beatriz Fonseca
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA


Profa. Dra. Eliane Pereira Mendonça
INSTITUTO FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO


Profa. Dra. Fabiana de Almeida Araújo Santos
FACULDADE PRESIDENTE ANTONIO CARLOS DE UBERLÂNDIA


Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi
ORIENTADORA

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

SÉRGIO EUSTÁQUIO LEMOS DA SILVA – nascido em Araguari, Estado de Minas Gerais, em 15 de setembro de 1974, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista (FMVA-UNESP), Campus de Araçatuba, em dezembro/2000. Durante a graduação desenvolveu relevantes atividades para formação sua acadêmica. Foi bolsista do Programa de Apoio ao Estudante da Pró-Reitoria de Extensão Universitária da UNESP no período de abril/1996 a março/1997. Foi membro titular da Representação Discente no Conselho do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da FMVA-UNESP/Araçatuba, no período de maio/1998 a abril/1999. Entre abril/1997 e julho/2000, realizou estágio e trabalho de iniciação científica na área de virologia e biologia molecular, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina Cardoso, professora titular do Departamento de Microbiologia da FMVA-UNESP/Araçatuba. Foi bolsista do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) por um período de três anos (1998-2000), sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina Cardoso. Em 2008, defendeu a dissertação de mestrado “Detecção do TAsTV-2 (*Turkey Astrovirus Type-2*) em amostras provenientes de perus (*Meleagris gallopavo*) com quadro de enterite”, na área de Genética e Bioquímica, sob a orientação da Prof.^a Dr^a. Ana Maria Bonetti, pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica do Instituto de Genética e Bioquímica (INGEB), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), onde foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) entre março/2007 a fevereiro/2008. Obteve título de Especialista em Ciências Avícolas pela Faculdade de Medicina Veterinária da UFU, em fevereiro de 2008. Obteve título de Especialista em Gestão da Saúde Pública pela Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná (UNICENTRO), em junho de 2012. Em 2014, iniciou o doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na UFU, na área de concentração Saúde Animal. Atualmente, atua no ensino superior, na graduação dos Cursos de Agronomia e Ciências Biológicas do Instituto Luterano de Ensino Superior da Universidade Luterana do Brasil (ILES/ULBRA), em Itumbiara-GO. Tem experiência nas seguintes áreas: microbiologia, virologia, biologia molecular, genética de microrganismos, patógenos aviários e de origem alimentar.

*"O temor do Senhor é o princípio da
sabedoria"*

Salmos 111:10

Ao Deus que fez o céu, a terra, o mar e
tudo quanto neles há.

A minha sábia e amada esposa Suziani.

Aos meus preciosos e amados filhos Laura,
Daniel e Matheo.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Hoje, realizei um sonho! O sonho de receber o grau acadêmico de Doutorado. Sonho concebido aos 11 anos de idade quando, ao iniciar meu ofício de professor, comecei a entender o meu chamado para mestre e ainda, que de forma bem imatura, para pesquisador. Hoje, entendo que realizar meu sonho de ser certificado Doutor é receber a comprovação da capacidade de desenvolver investigação em um determinado campo da ciência. Hoje, se passaram 18 anos da conclusão da minha graduação em Medicina Veterinária e, desde então, Deus me levou a muitos caminhos e lugares, planejados e cada qual com um propósito. Em um desses caminhos, tive a felicidade e o privilégio de encontrar minha esposa, mulher linda, virtuosa e sábia. Casados, cruzamos fronteiras, choramos o adeus ao nosso filho Daniel e celebramos com júbilo a vida do nosso filho Matheo. Deus nos sustentou e consolou em cada circunstância, cumprindo a sua Palavra: *“Até aqui, o Senhor nos sustentou”*. Sim! Ele é nosso refúgio e fortaleza, por isso, somos contentes! Hoje, às vésperas de realizar esse sonho, agradeço a Deus por tudo que tem feito por nós! Agradeço, também, a minha esposa Suziani e aos meus filhos Laura, Daniel e Matheo por juntos construirmos uma história. Muito obrigado, amo vocês!!!

Agradeço a minha mãe Iraci, meu pai João e minha avó Anelita! Sem o sacrifício (quanto sacrifício!!!) e o cuidado deles eu não estaria aqui. Muito obrigado, queridos!

Agradeço a minha orientadora Daise Rossi! Sem a sua aceitação, apoio e atenção, meu caminho a percorrer para realizar esse sonho seria bem mais difícil. Obrigado pela acolhida no LABIO para os ensaios com a salmonela. Recentemente, em um fim de semana, fiquei grandemente constrangido com sua dedicação, ao receber suas correções e sugestões tão relevantes para o meu trabalho. Como eu me senti feliz e mais seguro! Muito obrigado, Daise!

Agradeço a minha co-orientadora Cris! Como retribuir tudo que fez e faz por mim? Realmente, temos caminhado juntos durante todos esses anos e o seu apoio tem me

levado mais longe. Apenas, posso escrever “*Obrigado de coração!*” e “*Pode contar comigo para sempre!*”. Tenho muito orgulho de ter sido o seu primeiro orientando na iniciação à pesquisa. Tudo o que aprendi na pesquisa científica devo a você. Muito obrigado, Cris!

Agradeço a minha orientadora de mestrado Ana Maria Bonetti pela atenção e acolhimento sempre a mim dispensados na UFU. Sou grato também por disponibilizar os equipamentos do Laboratório de Genética para armazenamento de amostras para análises. Muito obrigado, Bonetti!

Agradeço a equipe de pesquisadores do Laboratório de Virologia da UNESP-Araçatuba, Helena, Andrea, Felipe, Roberto, Carolina, Dielson, Juliana e Silvia, pelo suporte nas análises laboratoriais e estatísticas. Muito obrigado, pessoal!

Agradeço à Helena Lage da USP. Sem o seu apoio nos trabalhos de pesquisa com coronavírus e metapneumovírus, minha trajetória seria bem mais árdua. Muito obrigado, Helena!

Agradeço à Andrea Fontes e ao Marcos Maioli da UNESP pelo suporte nos estudos e aconselhamentos em apoptose e respiração celular. Muito obrigado, pessoal!

Agradeço ao Dr. Márcio Botrel do Laboratório Laudo de Uberlândia pelo suporte nos esclarecimentos de dúvidas com a Bronquite Infecciosa das Galinhas. Muito obrigado!

Agradeço à equipe de pesquisadores do Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada (LABIO), Roberta, Eliane, Guilherme, Marcelo e Francesca, pelo acolhimento e pelos ensinamentos práticos em microbiologia. Muito obrigado, pessoal!

Agradeço ao meu amigo Diógenes (RODOBAN) pelos auxílios de sempre em assuntos de informática, vídeos, formatações, *downloads*, *backups*, inserções e conversões de

arquivos. Agradeço, também, a toda sua família pela torcida, força e companheirismo de longa data. Muito obrigado, Diógenes, Fernanda e Felipe!

Agradeço à Renata Macedo por ser presente e ter um papel tão importante na minha vida. Amável, alegre, atenciosa e, sempre, habilidosa em desfazer mentiras e indicar as verdades, que trazem luz e coragem. Sua presença tem trazido fôlego. Muito obrigado pelo seu cuidado tão sincero comigo e com minha família, Renata!

Agradeço ao colega de pós Guilherme Paz (Gui) por estar sempre pronto a ajudar-me com os assuntos acadêmicos, da pós e do laboratório e, também, nas traduções de idiomas. Muito obrigado, Gui!

Agradeço ao Laboratório BIOVET pelas análises sorológicas. Muito obrigado!

Agradeço à empresa avícola integradora pela cessão das amostras para a pesquisa. Muito obrigado!

Agradeço ao programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus professores pela oportunidade de realizar do curso de doutorado. Muito obrigado!

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento de toda a pesquisa. Muito obrigado!

Agradeço a todas as pessoas que passaram por minha vida e, indireta ou diretamente, contribuíram para a minha construção pessoal e profissional. Muito obrigado!

Agradeço às professoras que compõem esta banca de defesa, Bonetti, Bia, Eliane e Fabiana, por aceitarem o convite e se disponibilizarem a realizar a leitura, correções e avaliação deste trabalho. Muito obrigado, professoras!

RESUMO

Os macrófagos desempenham papéis importantes na mediação de respostas imunes inatas induzidas pelo Vírus da Bronquite Infecciosa (IBV) e são protagonistas da conexão entre estas respostas com a imunidade adaptativa. O IBV se replica nas células epiteliais e em macrófagos residentes nos órgãos respiratórios do *Gallus gallus domesticus*, no entanto, os mecanismos de geração da resposta imune inata contra a infecção viral nesses tecidos, bem como, as alterações morfológicas dos macrófagos aviários, não estão caracterizados totalmente. Este estudo possuiu como objetivo analisar as respostas imunes inata e adaptativa humoral ao IBV por meio da detecção da disfunção mitocondrial de macrófagos aviários da linhagem HD11 infectados pela estirpe viral Mass-41 e da investigação da soroprevalência do IBV em planteis de hospedeiros não vacinados. As investigações foram realizadas com o uso das técnicas de Citometria de Fluxo e ELISA, de acordo com as instruções técnicas dos fabricantes. A expressão mais pronunciada de alterações nas células do sistema fagocítico mononuclear foi a de um número elevado de células apoptóticas precoces em todos os períodos pós-infecção. A infecção viral foi associada à despolarização da membrana mitocondrial e à produção de espécies reativas de oxigênio. No teste sorológico, foi observada uma positividade para anticorpos Anti-IBV de 34% no total dos planteis estudados. Este estudo demonstrou que a replicação viral leva à disfunção mitocondrial de macrófagos e, consequentemente, à imunossupressão dos hospedeiros. Além disso, evidenciou a importância da vacinação, visto que o IBV afeta diretamente a produção e viabilidade das aves, podendo levar à morbidade e mortalidade graves no rebanho.

Palavras-chave: Macrófagos. Apoptose. Mitocôndria. Citometria de fluxo. ELISA.

ABSTRACT

The macrophages play an important role in mediating innate immune responses induced by the Infectious Bronchitis Virus (IBV) and are protagonists in the connection between these responses and adaptive immunity. The IBV replicates in epithelial cells and macrophages resident in the respiratory organs of *Gallus gallus domesticus*; however, the mechanisms of generation of innate immune response against viral infection in these tissues, as well as, the morphological alterations of the avian macrophages, have not been fully characterized. Therefore, this study aimed to analyze the innate immune and humoral adaptive responses to IBV through the detection of mitochondrial dysfunction of HD11 avian macrophages infected by the Mass-41 viral strain and the investigation of IBV seroprevalence in flocks of non-vaccinated hosts. The investigations were performed with the use of Flow Cytometry and ELISA techniques, according to the technical instructions of the manufacturer. The most pronounced expression of changes in mononuclear phagocytic system cells was that of a high number of early apoptotic cells, in all postinfection periods. Viral infection was associated with mitochondrial membrane depolarization and the production of reactive oxygen species. In the serological test, a positivity was observed for Anti-IBV antibodies of 34% in the total of the studied subjects. This study demonstrated that viral replication leads to mitochondrial dysfunction of macrophages and, consequently, host immunosuppression. In addition, it showed the importance of vaccination, since the IBV directly affects the production and viability of the birds, which can lead to serious morbidity and mortality in the flock.

Keywords: Macrophages. Apoptosis. Mitochondria. Flow cytometry. ELISA.

LISTA DE QUADRO E TABELAS

CAPÍTULO 1

- Quadro 1.** Gêneros e espécies recentes de coronavírus e características 32
relativas aos hospedeiros naturais, tropismo tecidual e doenças
associadas.

CAPÍTULO 2

- Tabela 1.** Proportion of BrdU/PI labeled DH11 cells after 24, 48 and 72 h of IBV 77
M41 strain infection.

CAPÍTULO 3

- Tabela 1.** Total housing seroprevalence and comparison of seroprevalence of 87
anti-IBV antibodies regarding two different collection sites, R1 and R2
regions, using ELISA. The seropositivity was 34% from the total
sample of housing.
- Tabela 2.** Comparison of seroprevalence of anti-IBV antibodies regarding the 88
farm poultry types Integrated or Nuclei. There was difference between
the R1 and R2, with 29.63% and 52.63% of samples testing positive in
R1 and R2, respectively.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Representação esquemática da organização genômica do Vírus da Bronquite Infecciosa. 34
- Figura 2.** Microscopia eletrônica por coloração negativa de partículas de coronavírus com evidência do aspecto de coroa solar (amplificação 90.000x). 36
- Figura 3.** Representação estrutural do Vírus da Bronquite Infecciosa. 37
- Figura 4.** Ciclo replicativo do Vírus da Bronquite Infecciosa. 40
- Figura 5.** Indução da apoptose pelas vias Receptor de Morte e Mitocondrial. 63

CAPÍTULO 2

- Figura 1A.** Cytopathic effects in IBV M41 HD11 infected cells at 24, 48, and 72 h p.i. assessed by phase contrast microscopy. Uninfected HD11 cells were used as controls. IBV M41 cytopathic effects were characterized as lysis and rounding or darkening of cells. Microphotographs are representative of three replicates of each experiment (bars 40-µm). 76
- Figura 1B.** Cell proliferation, examined using an MTT assay, indicates progressive decreases, in comparison to uninfected cells (control). 76
- Figura 1C.** Analysis of IBV M41 antigen detection (green-arrows) in HD11 cells followed by DAPI counterstaining (blue) by immunocytochemistry at all indicated times p.i. Uninfected HD11 cells (control; bars 40-µm). Microphotographs are representative of three replicates of each experiment. 76
- Figura 1D.** IBV M41 titers were calculated to be higher at 72 h p.i. (* $p < 0.05$) 76

0.005) and are expressed as CEK TCID₅₀. Nascent virus particles were recovered from infected HD11 cells. These data were obtained from three different experiments.

- Figura 1E.** Frequency of detection of IBV antigen by IFA at 24, 48 and 72 h p.i. The mean value was statistically significant (*p < 0.005) (color figure online). 76
- Figura 2A.** Acoustic focusing cytometer analysis performed to measure JC-1 emission at all indicated times p.i. illustrated as % Δ of reactive cells in a bar graph. The data were obtained from three different experiments and processed using an Attune acoustic focusing cytometer with auto-fluorescence being excluded using a global compensation tool. 78
- Figura 2B.** C-1 staining revealed red deposits in HD11 infected cells (bars 40-μm). 78
- Figura 3A.** Detection of ROS production in HD11 cells infected with the IBV M41 strain, and respective controls, by flow cytometry analysis. These data are illustrated by density dot plot graphs where the x-axis corresponds to linear amplified ROS fluorescence and the y-axis indicates logarithmic ROS fluorescence. The fluorescence emission was acquired using a BL3A filter with auto-fluorescence being excluded using a global compensation tool (> 103), in a continuous line, using an Attune acoustic focusing cytometer. 79
- Figura 3B.** Effects of IBV M41 infection on mitochondrial membrane depolarization at 24, 48, and 72 h p.i. The presented microphotographs are representative images of three experiments. The arrows indicate the addition of compounds: C: control (macrophages without infection) or CCCP (1 μM of m-chlorophenyldrazone) acting as an uncoupler. 79
- Figura 3C.** Effects of IBV M41 infection on mitochondrial respiration at 24, 48 and 72 h p.i., showing a decrease in oxygen consumption. 79

CAPÍTULO 3

Figura 1. Map of the seroprevalence for the infectious bronchitis virus at both R1 and R2 site. **95**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BALT: *Bronchio Associated Lymphoid Tissues*

BIG: Bronquite Infecciosa das Galinhas

DNA: *Deoxyribonucleic Acid*

E: Pequena proteína de membrana

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

FACS: *Fluorescence Activated Cell Sorter*

FAO: *Food and Agriculture Organization*

FNT: Fator de Necrose Tumoral

GALT: *Gut Associated Lymphoid Tissues*

H: cepa Holland

HE: Hemaglutinina Esterase

IB: *Infectious Bronchitis*

IBV: *Infectious Bronchitis Virus*

ICTV: *Committee on the Taxonomy of Virus*

Ig: Imunoglobulina

IL: Interleucina

M: Glicoproteína integral de membrana

MALTs: *Mucosal Lymphoid Tissues*

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Mass: cepa Massachusetts

N: Nucleoproteína

NC: Nucleocapsídeo

NSP: *Non Structural Protein*

OIE: Organização Internacional das Epizootias

ORFs: *Open Reading Frames*

PAMPs: *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

pH: Potencial Hidrogeniônico

PHCoV: *Pheasant Coronavirus*

Pol: Polimerase

PRRs: *Pattern Recognition Receptors*

Rep: Replicase

RNA: *Ribonucleic Acid*

RNAs: *Messengers Ribonucleic Acids*

RNA pol: *Ribonucleic Acid Polymerase*

RpRd: *RNA-dependent RNA polymerase*

S: *Spike*

SNN: *Síndrome Nefrite-Nefrose*

SPF: *Specific Pathogen Free*

TCoV: *Turkey Coronavirus*

TLRs: *Toll-Like Receptors*

TGF: *Transforming Growth Factor*

UTR: *Untranslated Region*

µg: Micrograma

µL: Microlitro

µm: Micrômetro

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	19
1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos	24
3 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 O Vírus da Bronquite Infecciosa (IBV)	25
<i>3.1.1 Importância Sanitária e Econômica do IBV</i>	25
<i>3.1.2 Histórico do IBV</i>	26
<i>3.1.3 Classificação Taxonômica do IBV</i>	29
<i>3.1.4 Caracterização Genética e Estrutural do IBV</i>	33
<i>3.1.5 Replicação do IBV</i>	39
3.2 Bronquite Infecciosa das Galinhas: A Doença	41
3.3 Respostas Imunes do <i>Gallus gallus domesticus</i> ao IBV	47
<i>3.3.1 O Sistema Imunológico do <i>Gallus gallus domesticus</i>: Noções Gerais</i>	47
<i>3.3.2 Resposta Imune Inata do <i>Gallus gallus domesticus</i> ao IBV</i>	49
<i>3.3.3 Resposta Imune Adaptativa do <i>Gallus gallus domesticus</i> ao IBV</i>	55
3.4 Morte Celular Programada nas Infecções Virais	59
3.5 Citometria de Fluxo: Noções Básicas	65
3.6 <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> – ELISA	70
CAPÍTULO 2 – Artigo publicado no periódico <i>Archives of Virology</i> intitulado “Mitochondrial bioenergy alterations in avian HD11 macrophages infected with Infectious Bronchitis Virus.”	73
CAPÍTULO 3 – Manuscrito a ser submetido ao periódico <i>Brazilian Journal of Poultry Science</i> intitulado “Epidemiological risk of non- vaccinated flocks against Infectious Bronchitis Virus localized in Northwestern São Paulo, Brazil.”	81

CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
REFERÊNCIAS	98
ANEXO	114
Normas do periódico <i>Brazilian Journal of Poultry Science</i> – Capítulo	114
3	

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

A avicultura é um importante setor da produção animal do Brasil, contribuindo para a economia do país, consideravelmente. A exportação brasileira de carnes vem crescendo, substancialmente, no mercado internacional, com destaque principal para a produção de frango de corte. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), até 2020, estima-se que a carne de frango ocupe 48,1% das exportações mundiais, o que manterá o Brasil na posição de primeiro exportador mundial (BRASIL, 2017).

A alta densidade, imposta pelos modelos de produção industrial avícola intensiva, contribui para um decréscimo da qualidade do ar que é oferecido às aves em confinamento; em contrapartida, esses animais apresentam características genéticas evolutivas para alta eficiência e demanda cardiorrespiratória (WITT et al., 2011). Como consequência, esse tipo de sistema de criação avícola predispõe a enfermidades infecciosas que acometem o sistema respiratório, em especial, a Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG), que é comum em áreas com produção intensiva de aves e apresenta alta prevalência na avicultura (INOUE; CASTRO, 2009; KJAERUP et al., 2014; CHHABRA et al., 2016).

A BIG é uma doença viral, aguda, altamente contagiosa, causada por pelo Vírus da Bronquite Infecciosa (IBV, do inglês *Infectious Bronchitis Virus*), um *Gammacoronavírus*, que afeta aves *Gallus gallus domesticus* de todas as idades, resultando em processos patogênicos com taxas de mortalidade superiores a 50% em pintinhos com menos de quatro semanas de idade e perda da produção de ovos em reprodutoras (KAMEKA et al., 2014; SMITH et al., 2015). As consequências da BIG são relevantes, pelo fato de que, no curso dessa enfermidade, são geradas lesões significativas nos sistemas respiratório, urinário e reprodutor de aves de todas as idades, as quais resultam em severas perdas econômicas à indústria avícola mundial (CAVANAGH; NAQI, 2003; CAVANAGH, 2007; DOLZ et al., 2012).

Segundo Smith et al. (2015), a resistência à infecção pelo IBV é provocada pela resposta imunológica após a entrada do vírus no hospedeiro e envolve a participação de muitos componentes estruturais, moleculares e celulares. Em *Gallus gallus*

domesticus, as respostas imunes inata e adaptativa às infecções virais estão interligadas, sendo que a imunidade inata do sistema respiratório exercida pelos macrófagos é essencial para a proteção, cujo desenvolvimento depende da interação direta do IBV com a superfície mucosa (WANG et al., 2006). Além disso, a defesa inata local exercida pelas células do sistema fagocítico mononuclear é indispensável para a indução subsequente de uma imunidade adaptativa potente, tanto a nível local, ou seja, nas superfícies mucosas, como aos níveis sistêmicos (GUO et al., 2008). Entretanto, não mais importante, a resposta imune adaptativa humoral ao IBV tem sido descrita como a mais estudada pela avaliação de níveis de anticorpos no soro, lágrima e traqueia (CAVANAGH, 2007; CARON, 2010; OKINO et al., 2017)

Os macrófagos atuam, normalmente, na primeira linha de defesa contra a infecção pelo IBV. São componentes efetores da resposta imune natural do hospedeiro e desempenham um papel fundamental na depuração ou remoção precoce do vírus da traqueia. Estrategicamente, ao nível local, as espécies aviárias disponibilizam macrófagos nas mucosas do trato respiratório para destruir patógenos invasores. Isso indica que os fagócitos mononucleares de galinhas podem reagir rapidamente às infecções respiratórias por vírus (DE GEUS; VERVELDE, 2013). Nas mucosas, os macrófagos exercem papéis funcionais de fagocitose, secreção de citocinas e quimiocinas, além da apresentação de antígenos, que colaboram com o desenvolvimento das respostas imunitárias adaptativas aos antígenos virais (TATE et al., 2010). Entretanto, desde a última década, os mecanismos concernentes aos macrófagos, envolvidos na imunidade inata local da mucosa para eliminação do IBV, têm sido descritos como incipientes (WANG et al., 2006; GUO et al., 2008, OKINO et al., 2017).

Durante uma infecção primária pelo IBV, as respostas imunitárias inatas são induzidas pela ligação dos antígenos virais a receptores expressos na membrana de células fagocíticas da mucosa traqueal, especialmente, os do tipo Toll (TLRs, do inglês *Toll-Like Receptors*). Assim, receptores TLRs podem iniciar a resposta imune inata local na traqueia após o reconhecimento do IBV pelos macrófagos (GUO et al., 2008). Estudos apontam para o risco da BIG se configurar em uma zoonose (WINTER et al., 2008; ABD EL et al., 2009; ZHANG et al., 2012), ao sugerirem que essa ligação é

dependente de ácido siálico, e que receptores homólogos aos das mucosas de seres humanos, como o DCSIGN ou o L-SIGN, também fazem parte do complexo de receptores para o IBV em galinhas.

Devido à natureza altamente infecciosa do IBV e a sua disseminação em áreas com produções intensivas de aves, o manejo sanitário da indústria avícola exige medidas rigorosas de quarentena, mas as tentativas de manter os plantéis livres de IBV não têm sido bem-sucedidas, o que tem exigido o uso de vacinas para reduzir as perdas da produção. A BIG pode ser prevenida por vacinação de frangos com vírus vivos atenuados ou inativados (KJAERUP et al., 2014). Evidências crescentes indicam que a vacinação da mucosa pode induzir imunidade sistêmica e da mucosa local, enquanto que a imunização sistêmica, geralmente, não consegue provocar uma efetiva imunidade da mucosa (VALOSKY et al., 2005; GUO et al., 2008). Isto sugere que a imunidade local da mucosa é essencial para a proteção, e que seu desenvolvimento pode depender da interação direta da superfície da mucosa com o IBV (WANG et al., 2006).

A vacinação de galinhas e frangos criados em regiões endêmicas é a base do controle da BIG (MEEUSEN et al., 2007). A resposta imune adaptativa humoral de aves frente à vacinação contra o IBV tem sido amplamente estudada, na maioria das vezes, pela mensuração dos níveis de anticorpos no soro sanguíneo, com o uso de técnicas de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), Virusneutralização ou o teste da Inibição da Hemaglutinação, cujas magnitudes, quase sempre, apresentam pouca correlação com o estado de proteção à infecção pelo IBV, a julgar pela ampla existência de variantes virais (CAVANAGH, 2007).

As respostas imunes inatas e adaptativas, incluindo-se aí as mediadas por fatores humorais, induzidas após a infecção ou vacinação com o IBV, são caracterizadas por sua grande complexidade e por fatores que ainda são pouco conhecidos no que tange aos elementos capazes de exercer uma ou mais ações efetoras contra esse patógeno amplamente variável e que culminem na restrição da replicação do vírus, seguindo-se a sua eliminação do organismo hospedeiro (JORGENSEN et al., 2017). A apoptose, por exemplo, cuja via do Receptor de Morte, que é específica e mediada pelo sistema imunológico, é capaz de impedir lesões mais

severas e resultar na resolução de infecções virais (POONIA et al., 2009; JORGENSEN et al., 2017).

No processo de infecção viral, é difícil, senão impossível, que os vírus infectem uma célula sem ativar uma das vias do processo fisiológico da morte celular programada, denominada de apoptose (POONIA et al., 2009). Assim, a apoptose é um dos mecanismos de morte celular na defesa contra infecções virais no hospedeiro, onde a morte da célula previne a replicação e disseminação viral. Nesse processo, na via apoptótica do Receptor de Morte, específica do sistema imunológico, as proteínas virais são inseridas nas membranas mitocondriais, apresentando efeitos anti e/ou pró-apoptóticos, que determinam a sobrevivência ou morte celular (JORGENSEN et al., 2017). No entanto, indesejavelmente, as infecções virais interferem na produção bioenergética das mitocôndrias da célula hospedeira, por afetarem a função respiratória celular (SCOTT, 2010; WEST et al., 2011). Desse modo, a compreensão da defesa imune inata por apoptose decorrente da infecção por IBV, bem como de seus efeitos indesejáveis, pode apontar caminhos para promover a resolução da doença e beneficiar o hospedeiro (JORGENSEN et al., 2017).

Células aviárias infectadas por vírus respiratórios podem produzir milhões de novas partículas virais em um período de poucas horas, o que agrava o processo patológico e a disseminação das infecções respiratórias. Em geral, uma diversidade de imunidade inata e adaptativa deve ser ativada para a defesa precoce do hospedeiro contra a invasão do IBV e, ainda, é responsável pela remoção rápida do vírus do local de infecção ou do sítio de replicação, controlando a disseminação do agente viral (WANG et al., 2006). Assim, as respostas imunitárias em mucosas e sistêmicas são determinantes para a proteção das aves contra doenças clínicas e, assim, evitar a mortalidade causada por agentes patogênicos de mucosas como, por exemplo, o IBV. Desse modo, a imunidade ou resistência do hospedeiro contra infecções víricas depende da atuação integrada da resposta imune inata e da resposta imune adaptativa, no entanto, os seus mecanismos são pouco estudados (QI et al., 2017; JORGENSEN et al., 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo possuiu como objetivo geral investigar disfunção mitocondrial em macrófagos aviários da Linhagem HD11 infectados pela estirpe Massachusetts 41 (M41) do Vírus da Bronquite Infecciosa e, também, investigar a soroprevalência do vírus em granjas do noroeste paulista, que não realizam vacinação compulsória, porém, necessária para prevenir a doença.

2.2 Objetivos Específicos

Especificamente, este estudo teve os seguintes objetivos:

Investigar em macrófagos aviários da linhagem HD11 infectados pela estirpe M41 do IBV, após 24, 48 e 72 horas:

- a) indução à infecção, replicação e liberação de novos virions;
- b) efeitos citopáticos;
- c) apoptose e necroptose;
- d) produção de espécies reativas de oxigênio;
- e) despolarização de membrana mitocondrial;
- f) consumo de oxigênio mitocondrial.

Em planteis de *Gallus gallus domesticus* com finalidade para corte, não vacinados e oriundos da região noroeste paulista:

- a) realizar a sorologia para o IBV, utilizando a técnica de ELISA indireto;
- b) determinar a soroprevalência do IBV;
- c) analisar a soroprevalência para o IBV entre áreas definidas, comparativamente.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O Vírus da Bronquite Infecciosa

3.1.1 Importância Sanitária e Econômica do IBV

O IBV é um membro de um extenso grupo de vírus denominado coronavírus. Por definição, é um vírus natural de aves domésticas pertencentes à subespécie *Gallus gallus domesticus*, popularmente, conhecidas como pintainhos, frangos ou galinhas, de acordo com a sua finalidade ou ciclo de vida. Nesses hospedeiros, é descrito como o agente etiológico da BIG, uma síndrome aguda e altamente infecciosa, cujos efeitos adversos a coloca como um dos mais importantes problemas sanitários para os planteis avícolas comerciais (CAVANAGH, 2007).

A BIG está incluída nas listas de notificação de doenças da Organização Mundial de Saúde Animal (*World Organization for Animal Health*, sucessora da Organização Internacional das Epizootias – OIE) e da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO, do inglês *Food and Agriculture Organization*) como doença transmissível de notificação anual, que tem importância socioeconômica e implicações sanitárias, podendo trazer repercussões iminentes ao comércio internacional de produtos e animais (ITO, 2006; OIE, 2018). No Brasil, a BIG também compõe a lista de doenças que requerem notificação mensal ao MAPA de qualquer caso confirmado (BRASIL, 2013). Os critérios de inclusão nessas listas estão relacionados ao fato da ampla capacidade de disseminação do IBV, mesmo em criações de aves vacinadas, e ao envolvimento de uma ampla gama de variantes virais, ocasionando, conseqüentemente, enormes prejuízos diretos e indiretos. Na Inglaterra, uma análise econômica das perdas provocadas por esse vírus estimou que a BIG é uma das doenças respiratórias mais importantes em aves comerciais, responsável por perdas de, aproximadamente, 23 milhões de libras anualmente (JONES, 2010).

As perdas econômicas estão relacionadas ao comprometimento do estado geral da ave, oriundo da forma respiratória da doença, aos impactos no trato reprodutivo e na qualidade dos ovos. Em poedeiras, pode causar severo declínio na produção e,

posteriormente, diminuição do tamanho, da qualidade interna e da casca do ovo (LIU et al., 2009). No Brasil, embora não existam dados publicados da quantificação econômica das perdas ocasionadas pelo IBV, a doença causada por esse vírus é considerada um dos problemas mais relevantes na área da sanidade em avicultura (MONTASSIER et al., 2008). Empresas de frangos de corte já relataram grandes prejuízos, decorrentes do aumento de problemas respiratórios e de lesões musculares em frangos com mais de 28 dias de idade, causando importantes perdas por condenação total ou parcial da carcaça no momento do abate (ASSAYAG, 2004).

Mundialmente distribuído, o IBV tem provocado efeitos devastadores sobre a agroindústria avícola dos países. Com alta prevalência e incidência no sistema intensivo de produção de aves comerciais, o vírus é responsável por perdas significativas no setor econômico avícola (CAVANAGH, 2007; MENDONÇA et al., 2009). Há grande impacto econômico, por causar diminuição na produção de ovos, bem como queda da qualidade interna e externa dos mesmos, diminuição da eclodibilidade, da eficiência alimentar e do ganho de peso, condenação de carcaças de frangos ao abate, além dos gastos com medicamentos para debelar infecções bacterianas oportunistas (CAVANAGH; NAQI, 2003; MA et al., 2012). Geralmente, a mortalidade é baixa, cerca de 5%, no entanto, algumas estirpes virais também podem causar nefrite e, então, a mortalidade pode ser superior a 50%, ou até 80% com alguns isolados australianos (SMITH et al., 2015).

3.1.2 Histórico do IBV

Os primeiros efeitos patogênicos do IBV foram observados no estado da Dakota do Norte, Estados Unidos, em 1931. Na ocasião, Schalk e Hawn relataram uma doença respiratória grave em aves jovens da espécie *Gallus gallus*, com elevada mortalidade, que foi notificada como uma Bronquite Infecciosa de pintinhos. Após criteriosas e subsequentes investigações com modelos de infecção experimental, a doença foi identificada como Bronquite Infecciosa (IB, do inglês *Infectious Bronchitis*) (WITT et al., 2011). No entanto, a comprovação da etiologia viral da IB se fez apenas após o cultivo e isolamento em ovos embrionados de galinha por Beaudette e Hudson, em 1937. Essa

primeira cepa viral foi inicialmente identificada como Beaudette 66579 e, posteriormente, foi classificada como sorotipo Massachusetts (cepa M42), por ter sido re-isolada no estado americano do mesmo nome, por Van Roeckel em 1941 que, na ocasião, foi identificada como cepa M41 (BROOKS et al., 2004).

Também em 1946, no estado de Connecticut, Estados Unidos, uma amostra variante de IBV (cepa A-5968) foi isolada de tecido respiratório de galinhas e denominada de sorotipo Connecticut, por não ser relacionada sorológica e patogenicamente ao sorotipo Mass (CAVANAGH; NAQI, 2003). Um estudo pioneiro realizado em 1956 por Jungher e colaboradores demonstrou por meio da técnica de soroneutralização, que os vírus isolados em Connecticut e em Massachusetts causavam doenças similares, no entanto, não forneciam proteção cruzada. Este estudo comprovou que o IBV não é homogêneo e, portanto, há existência de mais de um sorotipo para esse vírus (CAVANAGH; NAQI, 2003; COOK et al., 2012).

Desde que o IBV foi descrito pela primeira vez, muitos sorotipos foram identificados pelo mundo e novas variantes emergiram (MCKINLEY et al., 2008). Na década de 50, a amostra M41, caracterizada como vírus respiratório, se expandiu para a Europa, Ásia e Brasil. A cepa Holland (H), considerada do tipo Massachusetts, foi isolada na Holanda em 1955 e, por ser um vírus altamente resistente à tripsina, deu origem às vacinas H52, H120 e H90, que se tornaram amplamente utilizadas em planteis comerciais, sendo a H120, sem dúvida, a vacina mais utilizada no mundo até hoje (BIJLENGA et al., 2004; COOK et al., 2012).

Até a década de sessenta, acreditava-se que o IBV causava enfermidade exclusivamente respiratória, o que foi contradito pela associação a um quadro clínico de Síndrome Nefrite-Nefrose (SNN) em planteis comerciais de galinhas infectadas pelo IBV, tanto nos Estados Unidos em 1962, quanto na Austrália em 1963. A amostra viral australiana, isolada em 1963, foi identificada como cepa T ou N1/N62 e, assim como o vírus norte-americano, possuía também, além do tropismo para o sistema respiratório, características uropatogênicas, o que a tornou o protótipo das estirpes nefropatogênicas do IBV. No início da década de 60, a doença já havia sido notificada em quase todo o mundo (MCKINLEY et al., 2011).

Desde 1940, inúmeras estirpes de IBV têm sido isoladas nos Estados Unidos, América Latina, Europa e na Ásia (JACKWOOD, 2012; AL-SHEKAILI et al., 2015). No Brasil, o primeiro registro do IBV deu-se em 1957, no Estado de Minas Gerais, envolvendo pintinhos com quadro respiratório brando e sem mortalidade, cujo isolamento viral em ovos embrionados de galinha do vírus foi realizado por Osmane Hipólito, na Universidade Federal de Minas Gerais (HIPÓLITO, 1957). Posteriormente, em 1973, o mesmo pesquisador publicou o primeiro isolamento de duas amostras nefropatogênicas de IBV, a partir de tecido renal de galinhas com quadro clínico de SNN, no Estado de São Paulo (HIPÓLITO et al., 1973).

Em 1979, devido à constatação da ampla disseminação da IB no Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, oficialmente, licenciou a importação e a produção local de vacina viva atenuada ou inativada contra o IBV, oriunda da cepa Holland (amostras H120 e H52), para uso em todo o país; com base nos bons resultados obtidos com a mesma em outros países e na maior prevalência desta nos mesmos. Em 1980, as vacinas inativadas contendo a mesma amostra foram introduzidas no país, no entanto, os resultados não foram tão satisfatórios, apesar de uma redução significativa dos problemas associados à doença (SILVA, 2010).

Apesar da introdução oficial da vacinação contra o IBV no Brasil, em 1979, surtos de BIG têm sido frequentes e a maioria dos isolados de campo de IBV brasileiros, recuperados até 1989, foi classificada como sorotipo Massachusetts (ITO, 2006). No entanto, Di Fábio et al. (2000) relataram que apenas um, entre quinze isolados de campo de IBV, eram pertencentes ao sorotipo Mass e os outros quatorze eram classificados dentro de grupos antigênicos distintos daqueles descritos anteriormente em outros países. A presença de um genótipo brasileiro, genótipo BR-I, foi relatado por todo o território nacional, assim como, tem sido encontrado em territórios distantes, incluindo outros países da América Latina (CHACON et al., 2011; BALESTRIN et al., 2014). Segundo Jackwood (2013), devido à rápida replicação e alta taxa de mutação do IBV, uma extensa diversidade genética de estirpes do vírus já foi relatada na América Latina, assim como, estão presentes no Brasil os sorotipos Arkansas, Massachusetts, 793B (4/91) e as três únicas variantes brasileiras BR1, BR2 e BR3. Esse fato

epidemiológico é considerado extremamente importante por influenciar nos desafios relacionados à prevenção da doença.

Distribuído mundialmente, a existência de centenas de sorotipos e variantes do IBV já foi relatada, com baixa ou nenhuma proteção cruzada entre eles (CAVANAGH, 2007, JACKWOOD et al., 2009). Muitas variantes com mudanças no genoma têm sido identificadas, que incluem deleções, inserções, mutações pontuais e, em alguns casos, recombinações que ocorrem continuamente na natureza (CAVANAGH e NAQI, 2003). Dentre os sorotipos existentes, os mais conhecidos são: Massachusetts, Connecticut, Beaudette, Arkansas, 793B (4/91), D274, D1466, Italy-02 e QX (CAVANAGH, 2007; DHAMA et al., 2014).

3.1.3 Classificação Taxonômica do IBV

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV, do inglês *Committee on the Taxonomy of Virus*), o vasto grupo de coronavírus pertence à ordem *Nidovirales*, que abarca as famílias *Coronaviridae*, *Arteviridae*, *Roniviridae* e *Mesoniviridae*. A nomenclatura do táxon *Nidovirales* é originada do latim *Nidus*, cujo significado é ninho, nome dado em referência à quantidade de ácidos ribonucleicos mensageiros (mRNA, do inglês *Messenger Ribonucleic Acid*) subgenômicos produzidos durante replicação, que confere a principal característica dos nidovírus. Semelhanças na sequência gênica dos membros dessa ordem foram identificadas, propondo que esses vírus evoluíram de um ancestral comum (ICTV, 2015).

A espécie IBV pertence à família *Coronaviridae*, subfamília *Coronavirinae* e ao gênero *Gammacoronavirus*. A família *Coronaviridae* é dividida em duas subfamílias *Torovirinae* e *Coronavirinae*, sendo que esta última compreende os gêneros *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* e *Gammacoronavirus*. Essa divisão se baseou na análise genética dos domínios conservados do Gene da RNA Polimerase (RNA Pol, do inglês *Polymerase Ribonucleic Acid*), nos epítomos de glicoproteínas do envelope, na reatividade sorológica cruzada e nos hospedeiros naturais (WOO et al., 2012; ICTV, 2015).

Historicamente, a classificação taxonômica dos coronavírus tem sido um assunto em constante revisão ao longo dos anos. De forma sucinta, até 2009, os gêneros eram tratados como grupos com base em características das partículas virais obtidas por análises genotípicas e sorológicas. Até então, os coronavírus estavam divididos em três grupos, denominados I, II e III. Nesta classificação, os grupos I e II incluíam vários coronavírus de mamíferos, e o grupo III era o representante exclusivo das espécies aviárias, como o IBV e outros vírus filogeneticamente relacionados, como o Coronavírus dos perus (TCoV, do inglês *Turkey Coronavirus*), Coronavírus dos Faisões (PHCoV, do inglês *Pheasant Coronavirus*), Coronavírus de Gansos, Coronavírus de Marrecos, Coronavírus de pombos e outros ainda em estudo (CAVANAGH, 2005; 2007; ARIAANS et al., 2008; WOO et al., 2010).

Em 2009, com o advento de metodologias moleculares sensíveis à detecção viral e o aumento do interesse em estudos sobre os coronavírus, novas espécies de IBV foram identificadas e os grupos tradicionais de taxonomia foram substituídos pelos gêneros *Alfacoronavírus* (Grupo I), *Betacoronavírus* (Grupo II) e *Gammacoronavírus* (Grupo III) (WOO et al., 2009). Nesta nova definição, os dois primeiros gêneros conservam as espécies alocadas em seus grupos antigos respectivos, no entanto, descobriu-se que, além de aves, os *Gammacoronavírus* podem infectar mamíferos. E ainda, um quarto gênero, o *Deltacoronavírus*, que engloba isolados de aves e suínos, foi reconhecido pelo ICTV (WOO et al., 2009; JACKWOOD et al., 2012; WOO et al., 2012). Assim, gradativamente, as espécies virais estão sendo classificadas em gêneros e não mais em grupos.

Classicamente, a espécie de coronavírus natural da subespécie *Gallus gallus domesticus* é conhecida como o IBV. A maioria das espécies dos coronavírus infecta, naturalmente, apenas uma espécie de animal ou, no máximo, um número limitado de espécies, dependendo da espécie viral. Porém, diferentes estirpes de coronavírus, caracterizados por uma diversidade fenotípica e genotípica, são capazes de infectar uma variedade de hospedeiros como os mamíferos (humanos, camundongos, ratos, suínos, cães, felinos, coelhos, equinos, bovinos e morcegos) e as aves (galinhas, perus e faisões), sendo associados a uma vasta gama de enfermidades, como respiratórias, entéricas, neurológicas e hepáticas (Quadro 1). A gravidade das lesões causadas pelos

vírus é variável, dependente da estirpe viral envolvida e da espécie infectada (LAI et al., 2007; GÓES et al., 2011).

Quadro 1 – Gêneros e espécies recentes de coronavírus e características relativas aos hospedeiros naturais, tropismo tecidual e doenças associadas.

Gênero	Espécies	Hospedeiro natural	Tropismo Tecidual	Doenças associadas
<i>Alfacoronavírus</i>	HCoV-229E	Humano	Trato Respiratório	Infecção respiratória branda (resfriado comum)
	HCoV-NL63	Humanos	Trato respiratório	Infecção respiratória branda, Croup
	TGEV	Suínos domésticos e selvagens	Epitélio do trato respiratório e entérico	Infecção respiratória e entérica
	FIPV	Felinos domésticos e selvagens	Peritônio, fígado e órgãos linfoides	Peritonite Infecciosa Felina
	PEDV	Suínos	Epitélio do trato entérico e respiratório	Infecção respiratória e entérica
<i>Betacoronavírus</i>	HCoV-OC43	Humanos	Trato respiratório superior	Infecção respiratória
	HCoV-HKU1	Humanos	Trato respiratório superior e inferior	Infecção respiratória
	SARS-CoV	Humanos	Trato respiratório	Síndrome Respiratória Aguda Grave
	BCoV	Bovinos	Trato entérico	Infecção entérica
<i>Gammacoronavírus</i>	IBV	Galinhas	Trato respiratório e renal	Infeção respiratória, entérica, renal e hepática
	TCoV	Perus	Duodeno, jejuno e íleo	Infeção respiratória e entérica
	BWCoV-SW1	Baleias	Fígado?	Infeção respiratória e hepática?
<i>Deltacoronavírus</i>	MuCoV	Munias (passeriforme)	?	?
	ALC-CoV	Leopardos asiáticos	?	?

Espécies de coronavírus representadas: HCoV-229E, Coronavírus Humano 229E; HCoV-NL63, Coronavírus Humano NL63; TGEV, Vírus da Gastroenterite dos Suínos; FIPV, Vírus da Peritonite

Infecciosa Felina; PEDV, Vírus da Diarreia Epidêmica dos Suínos; HCoV-OC43, Coronavírus Humano OC43; HCoV-HKU1, Coronavírus Humano HKU1; SARS-CoV, Coronavírus Associado ao SARS; BCoV, Coronavírus Bovino; IBV, Vírus da Bronquite Infecciosa; TCoV, Coronavírus dos Perus; BWCoV-SW1, Coronavírus de Baleia Beluga; MunCoV, Coronavírus de Munia e ALCCoV, Coronavírus de Leopardo. ? : ainda não esclarecido. Fonte: Adaptado de ICTV (2015).

A grande diversidade de hospedeiros e o tropismo celular dos coronavírus podem ser explicados pelas altas taxas de recombinações em consequência do seu mecanismo particular de replicação (LAI; CAVANAGH, 1997; WOO et al., 2012). A diminuição na fidelidade da replicação pode acarretar um maior número de mutações e recombinações, que deixam o vírus menos susceptível a atenuações e mais virulento. Foi demonstrado que os coronavírus toleram um limite de falhas durante o processo de replicação. Isso significa dizer que esses vírus se replicam sempre com uma taxa limite de erro. Dessa forma, os coronavírus são mutantes estáveis, que possuem o maior genoma entre os vírus RNA, com um sistema único de replicação, gerando altas taxas de recombinações, que podem ser responsáveis pela adaptação do vírus a novos hospedeiros (SMITH; DENISON, 2012).

3.1.4 Caracterização Genética e Estrutural do IBV

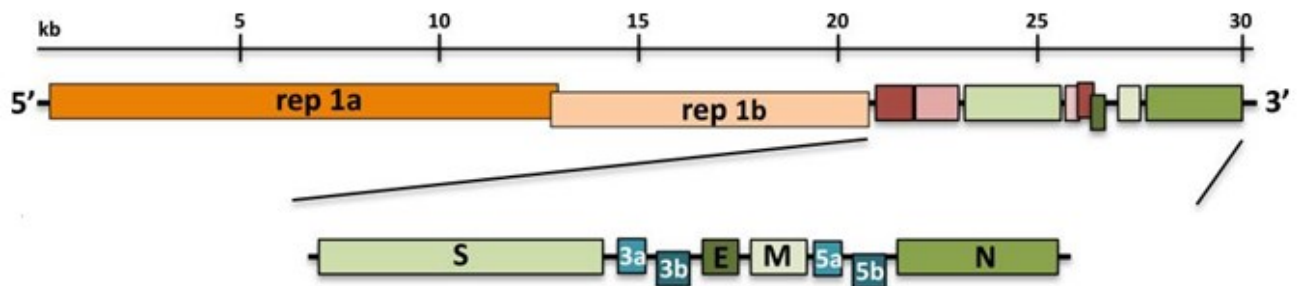
O IBV, primeiro coronavírus isolado, é considerado o vírus protótipo da família *Coronaviridae*, pois foi o primeiro coronavírus a ter o genoma completamente sequenciado (CAVANAGH, 2007). O genoma é formado por uma molécula única e não segmentada de RNA, cujo comprimento é de aproximadamente de 27.600 nucleotídeos e, por isso, é considerado um dos maiores genomas entre os vírus RNA já relatados (MONTASSIER et al., 2008). Como nos eucariotos, a molécula de RNA dos coronavírus é metilada na extremidade 5' e poliadenilada na 3', e se caracteriza, ainda, por apresentar polaridade positiva, ou seja, possuir a mesma orientação ou sentido para a leitura de um RNA mensageiro e, por isso, é considerado infectante (MCKINLEY et al., 2008).

A organização genômica do IBV é bastante conservada, ou seja, é semelhante entre todos os coronavírus já sequenciados. A sua fita de RNA está organizada em 7 a 14 regiões principais, cada uma contendo uma ou mais janelas abertas para leitura

(ORFs, do inglês *Open Reading Frames*), separadas por sequências intergênicas, que possuem promotores para a transcrição de mRNA mensageiros subgenômicos específicos. Em cada extremidade genômica, 5' e 3', encontra-se uma região não traduzida ou codificada (UTR, do inglês *Untranslated Region*), 5'UTR e 3'UTR, cada uma composta de aproximadamente 500 nucleotídeos (SAWICKI et al., 2007).

É fato que o amplo genoma do IBV compreende seis principais genes, que codificam proteínas estruturais e não estruturais, como mostra a Figura 1. Nesse modelo, da extremidade 5'UTR para a 3'UTR, a ordenação genômica do IBV é a seguinte: o gene complexo replicase (Rep), também conhecido como o gene da RNA Polimerase (RNA Pol); o gene da glicoproteína da espícula S (do inglês *Spike*); o gene 3, formado por três ORFs que codificam as proteínas 3a, 3b e 3c, sendo que esta última codifica a proteína E; o gene da glicoproteína M; o gene 5, constituído por duas ORFs que codificam duas proteínas não estruturais, 5a e 5b; e, por fim, o sexto gene, o gene que codifica a nucleoproteína N (FEHR e PERLMAN, 2015).

Figura 1 – Representação esquemática da organização genômica do Vírus da Bronquite Infecciosa.



Genes dos coronavírus: gene rep 1a, poliproteína replicase porção 1a; rep 1b, poliproteína replicase porção 1b; gene S, proteína *Spike*; 3a, proteína 3a; 3b, proteína 3b; E, pequena proteína de membrana; M, proteína integral de membrana; 5a e 5b, proteínas não estruturais e N, nucleoproteína. Fonte: Fehr; Perlman (2015).

Altamente conservado entre os membros do grupo 3, o gene RNA Pol faz parte do gene do complexo replicase, que ocupa cerca de dois terços de todo o genoma viral. O gene Rep é o único que é traduzido diretamente do genoma viral, todos os outros são traduzidos a partir de RNAs sub-genômicos (MASTERS; PERLMAN, 2013). Ele é constituído por duas ORFs sobrepostas, ORF1a e ORF1b, que codificam uma

poliproteína replicase 1ab, precursora da polimerase viral (Pol 1a e 1b). As poliproteínas 1a e 1b contêm uma proteinase 3c-like e uma proteinase papaína-like, que sintetizam 15 a 16 proteínas não estruturais (NSP1-NSP16, do inglês *Non Structural Protein*). Essas proteínas, como as proteínas helicase e a polimerase de RNA dependente de RNA (RpRd, do inglês *RNA-dependent RNA polymerase*), estão associadas à replicação e transcrição do genoma viral e, assim, o gene da RNA Polimerase é necessário e suficiente para a replicação e transcrição do genoma (LAI; CAVANAGH, 1997; CAVANAGH, 2007).

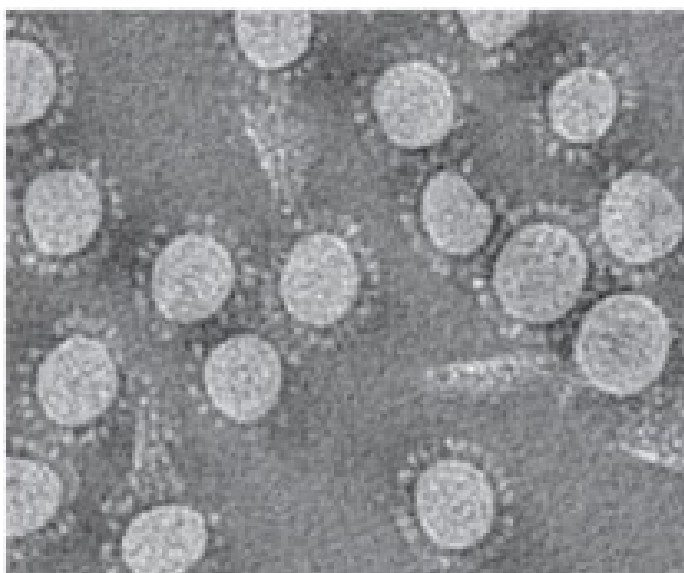
No terço final do genoma, próximo à 3'UTR, concentram-se os genes que codificam proteínas estruturais e acessórias. Nessa região, podem ser identificados quatro genes que codificam as proteínas S, E, N e M. Nos *Betacoronavírus*, logo após o Gene S, encontra-se o gene da hemaglutinina esterase (HE) (WEISS; NAVAS-MARTIN, 2005). As proteínas específicas e acessórias apresentam uma variação em suas propriedades, número e ordem entre os grupos dos coronavírus, mas são conservadas entre esses grupos, em geral (LAI; CAVANAGH, 1997; CAVANAGH, 2007). Os coronavírus também codificam um conjunto de proteínas acessórias cuja função é desconhecida, no entanto, sabe-se que não são requisitadas para replicação *in vitro* e que podem desempenhar papel na patogênese (CASAIS et al., 2005; YOUNT et al., 2005).

O gene S codifica a principal proteína estrutural, a glicoproteína da espícula S, que é constituída por diversas projeções no envoltório externo viral (BELOUZARD et al., 2012). O segmento gênico de S1 é o mais variável e pode apresentar mutações em sua sequência de aminoácidos, que acarretam alterações na antigenicidade e no tropismo tecidual das estirpes mutantes do IBV. Estas variações podem ocorrer em torno de 2 a 25% na sequência de aminoácidos. Em contrapartida, a porção gênica de S2 é mais conservada (CAVANAGH et al., 1992; CAVANAGH et al., 1997; CAVANAGH; NAQI, 2003). É importante ressaltar que a variação gênica de algumas regiões codificadoras da glicoproteína S, especialmente aquelas correspondentes aos sítios de neutralização viral, passa a se constituir na principal estratégia do IBV para escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro (CAVANAGH et al., 1997; MURPHY et al., 1999).

Segundo Fernando (2013), diversas alterações podem ocorrer na composição, estrutura e propriedades antigênicas das proteínas do IBV em decorrência de fenômenos de mutação e recombinação. Esses fenômenos afetam os genes codificadores dessas proteínas e fazem parte do processo evolutivo do agente viral. Esses eventos são responsáveis pela ampla variabilidade genética e antigênica do IBV, que repercute na emergência de diferentes tipos patogênicos com variadas formas de patogenicidade, cuja definição é patótipos. Dessa forma, as alterações genéticas tornam o controle da infecção pelo IBV extremamente difícil.

A denominação coronavírus foi sugerida em 1968, em alusão à aparência viral semelhante à de uma coroa solar ou real, quando observada à microscopia eletrônica. Dessa forma, a nomenclatura viral teve origem da palavra *corona*, em latim, que significa uma coroa ao redor de um astro ou rei, como ilustra a Figura 2. O aspecto sugestivo de coroa real é conferido por proteínas virais estruturais bem demarcadas, distribuídas e proeminentes em toda a superfície viral, que se projetam da matriz para o exterior do seu envelope viral (WEISS; NAVAS-MARTIN, 2005; FEHR; PERLMAN (2015).

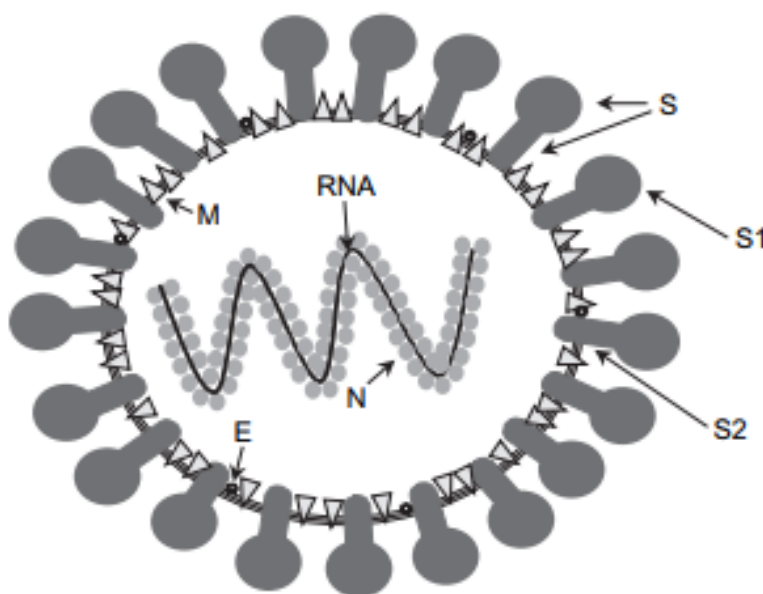
Figura 2 – Microscopia eletrônica por coloração negativa de partículas de coronavírus com evidência do aspecto de coroa solar (amplificação 90.000x).



Fonte: Fehr; Perlman (2015).

As partículas do IBV são grandes, com diâmetro médio de 120 nanômetros, predominantemente esféricas, todavia, podem apresentar pleomorfismo devido à presença de envelope. Estruturalmente, o IBV é composto por um envelope lipoproteico e quatro tipos de proteínas (HOLMES, 2003), como apresentado na Figura 3. A nucleoproteína **N** interage intimamente com o genoma viral para originar um nucleocapsídeo **NC** de simetria helicoidal. As demais proteínas, a glicoproteína de superfície da espícula **S** (do inglês *Spike*), a pequena proteína de membrana **E** e a glicoproteína integral de membrana **M** estão inseridas no envelope, de onde se projetam externamente (CAVANAGH, 2005).

Figura 3 – Representação estrutural do Vírus da Bronquite Infecciosa.



Componentes estruturais virais: S, proteína *Spike*; S1, subunidade 1 de *Spike*; S2, subunidade 2 de *Spike*; M, proteína integral de membrana; E, pequena proteína de membrana; N, nucleoproteína e RNA, ácido ribonucleico. Fonte: Cavanagh (2003).

As proteínas S e N possuem importantes funções biológicas e imunológicas na constituição do IBV. A proteína S é determinante para o tropismo celular da estirpe envolvida e a patogênese consequente. Considerada uma proteína de superfície, é clivada pós-traducionalmente em duas subunidades proteicas S1 e S2, compostas por 500 e 600 aminoácidos, respectivamente (GALLAGHER; BUCHMEIERT, 2001). A

porção S1 é responsável pela infectividade viral, ou seja, pela ligação ao receptor celular, sendo a principal proteína responsável pela indução de resposta imune do hospedeiro e da produção de anticorpos neutralizantes; enquanto, a porção S2 se encarrega da fusão com a membrana celular do hospedeiro (CAVANAGH, 2005; CAVANAGH, 2007).

Essencial para a adsorção e fusão à membrana da célula hospedeira, a proteína S total é uma proteína de classe I, cuja fusão com a célula hospedeira ocorre após o contato com proteases da célula em uma subunidade distal e uma subunidade ancorada à membrana viral (BOSCH et al., 2003). Nesse sentido, pode-se afirmar que essa glicoproteína possui um papel biológico de elevada relevância para esse patógeno viral e para o organismo hospedeiro das aves, já que a glicoproteína S é a principal indutora da resposta imune, que é protetora contra a infecção pelo IBV (CAVANAGH, 2007).

As principais características ligadas à infectividade, virulência e variabilidade virais estão associadas às proteínas do envelope. O envelope viral circunda o nucleocapsídeo e, por ter origem da membrana celular do hospedeiro, é constituído por uma dupla camada lipoproteica. Dentro do envelope está localizado o core de ribonucleoproteína, o qual contém o genoma de RNA e a proteína N do nucleocapsídeo. Essa proteína N é uma fosfoproteína com aproximadamente 50 a 60 kiloDaltons de peso molecular que, junto com o RNA genômico, forma o nucleocapsídeo helicoidal (CAVANAGH, 2005).

A proteína N apresenta sequências conservadas, ocorrendo apenas pequenas variações entre as cepas de IBV conhecidas (CAVANAGH, 2007). Essa proteína forma uma concha protetora de 409 aminoácidos que confere proteção ao genoma viral contra as ribonucleases e, ainda, é capaz de incitar a resposta imune celular. Além disso, possui domínios de ligação do RNA à membrana e aos fosfolípidos, que promovem a formação das partículas virais. A ligação da proteína N com terminações 5' e 3' do RNA viral sugere que esta participa na modulação da replicação do RNA viral pela capacidade de se ligar à membrana, possibilitando a formação de novos complexos de transcrições (SAIKATENDU et al., 2007).

A proteína N do IBV se constitui na proteína principal do capsídeo e em uma infecção por esse vírus é produzida em grande quantidade. Além disso, essa proteína possui uma estrutura altamente conservada, aproximadamente 94% a 99% de identidade entre as mais importantes cepas de referência do IBV, além de ser altamente imunogênica. Essa proteína é capaz de induzir a produção de anticorpos e de linfócitos T efetores específicos, sobretudo com ação citotóxica. Dessa maneira, a proteína N do IBV abarca um número significativo de atributos para se constituir no antígeno de eleição para o desenvolvimento de ensaios sorológicos, como o ELISA, a serem empregados na detecção e mensuração de anticorpos anti-antígenos de grupos desse vírus (CAVANAGH, 2007).

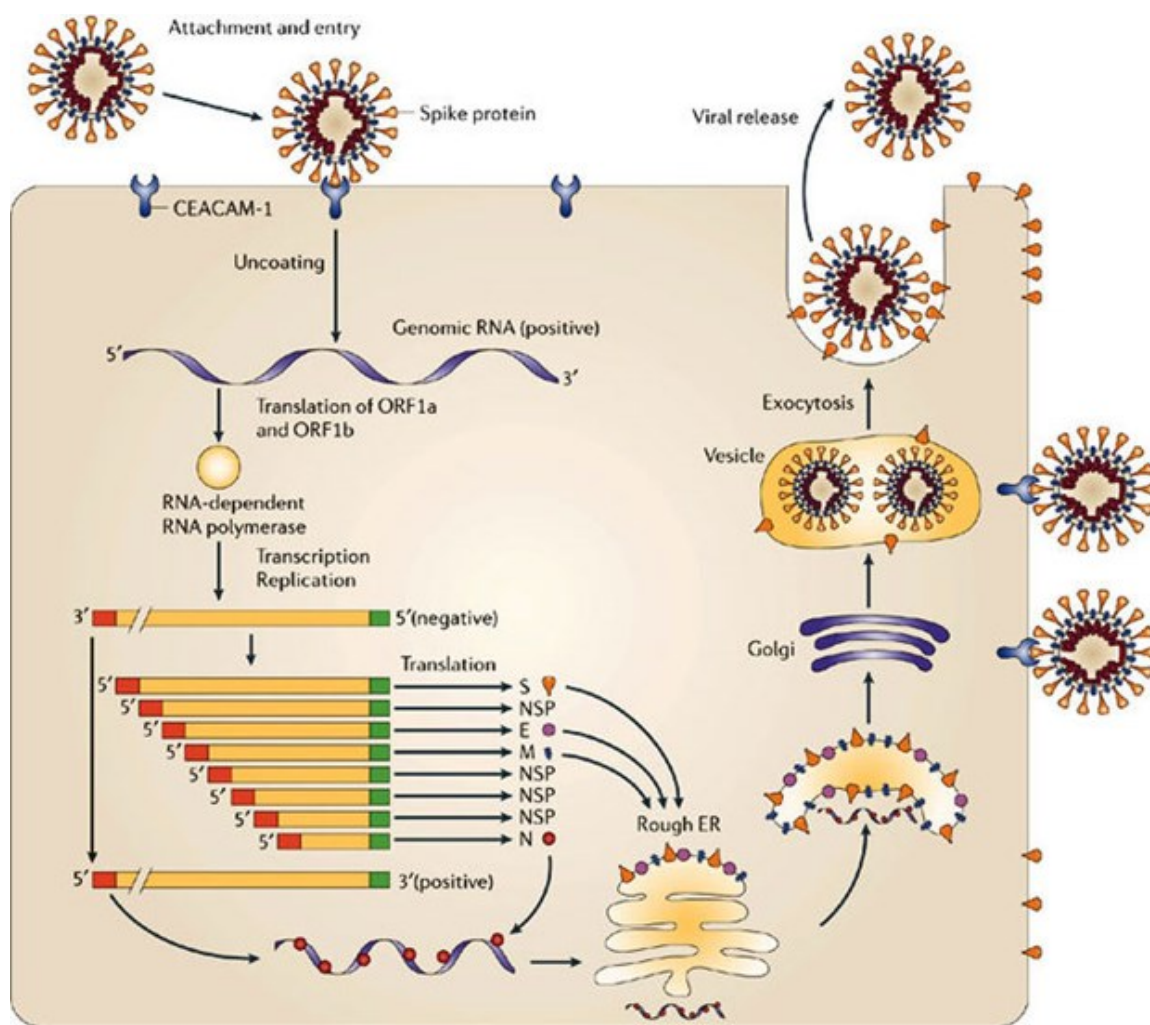
A proteína E é formada por aproximadamente 100 aminoácidos, que juntamente com a proteína M, é necessária para a maturação e formação de partículas virais integrais e maduras do IBV, desempenhando um papel importante na montagem viral (CAVANAGH, 2007). Se expressa sozinha, ou em conjunto com a proteína M, a proteína E forma partículas semelhantes às dos vírus (WEIS; NAVAS-MARTIN, 2005). No entanto, Kuo e Masters (2003) demonstraram baixas infectividade e taxa de replicação em um coronavírus da Hepatite Murina com deleção do gene da proteína E, indicando que essa proteína pode desempenhar importante papel na produção do vírus infeccioso.

A glicoproteína M está intimamente relacionada com o NC interno da partícula viral. Contem cerca de 230 aminoácidos sendo que desses, somente 10% estão exteriorizados no envelope viral (CAVANAGH, 2007). Sua função primordial é compor a montagem do invólucro da partícula viral, no qual interage com as proteínas de membrana celular no local de liberação da nova partícula viral. Esta proteína pode assumir duas conformações, uma porção alongada e associada a uma grande quantidade de proteínas S e à rigidez do envelope; e outra de conformação compacta e associada à flexibilidade da membrana e a uma menor quantidade de espículas (NEUMAN et al., 2011).

3.1.5 Replicação do IBV

O ciclo replicativo do IBV ocorre no citoplasma da célula hospedeira. Após ligação da glicoproteína S1 e fusão da glicoproteína S2 à superfície celular, ou seja, à membrana citoplasmática, ocorre a endocitose (Figura 4). Aparentemente, a fusão é dependente de pH ácido, com pH ótimo de 5,0. Como o IBV possui fita de RNA de sentido positivo, ele pode diretamente produzir suas proteínas e um novo genoma no citoplasma, onde, após a descapsidação, o RNA viral é liberado, dando início a sua replicação. Uma vez que o RNA genômico se liga aos ribossomos para a tradução e síntese de 16 polipeptídeos de 15.000 a 135.000 Daltons (STADLER et al., 2003; CHU et al, 2006; BERGMANN et al., 2006).

Figura 4 – Ciclo replicativo do Vírus da Bronquite Infecciosa.



Fonte: Bergmann et al. (2006).

Decorridas três a quatro horas do início da infecção, quantidades apreciáveis de partículas virais começam a ser liberadas das células infectadas, sendo que muitas partículas virais adsorvem-se à membrana citoplasmática e, deste local, podem interagir e estimular os diversos mediadores celulares do sistema imune. Essa característica dos coronavírus de serem liberados das células sem que ocorra a lise dessas mesmas células, parece ser um dos fatores responsáveis pela infecção persistente que este vírus pode estabelecer nos organismos hospedeiros. No entanto, comprovadamente, esse fenômeno só foi demonstrado para alguns isolados nefrotrópicos e enterotrópicos do IBV. Além disso, foi verificado que o nível máximo de geração de novas partículas virais durante o ciclo de replicação dos coronavírus, geralmente, ocorre após 12 horas do início da infecção (CAVANAGH; NAQI, 2003).

Durante o processo de replicação, o gene do complexo Rep é traduzido na proteína RdRp, responsável pela transcrição do RNA de sentido negativo, que servirá de molde para síntese do RNA de sentido genômico, que será incorporado a novas partículas virais e também a transcrição de RNAs sub-genômicos que serão traduzidos nas outras proteínas necessárias para a montagem viral. Cerca de 8 desses genes codificam para novas proteínas virais, incluindo N, M e S. A fosfoproteína estrutural N se liga ao RNA genômico para formar o NC, enquanto, a proteína M é integrada dentro da membrana do retículo endoplasmático. A proteína S, após se ligar à membrana, monta o NC com a fita de RNA torcida, ligando-se dentro do lúmen do retículo endoplasmático e é revestida com a membrana. Em consequência, os virions da progênie viral são transportados e montados nos aparatos de Golgi, internalizadas em vesículas e, finalmente, liberadas por exocitose (STADLER et al., 2003; DECARO; BUONAVOGLIA, 2011).

3.2 Bronquite Infecciosa das Galinhas: A Doença

A Bronquite Infecciosa das Galinhas é também conhecida, simplesmente, por Bronquite Infecciosa, uma doença respiratória viral, aguda, altamente contagiosa, caracterizada por estertores traqueais, tosse e espirros (CAVANAGH et al., 2003). O

IBV induz quadros clínicos variados, conforme a idade das aves e o tipo viral, podendo ou não apresentar sinais clínicos respiratórios. A infecção viral acomete aves de ambos os sexos, seja na criação para corte ou na produção de ovos (MONTASSIER et al., 2008). Os pintos são os mais suscetíveis e apresentam maior mortalidade, enquanto, as aves adultas apresentam sintomas respiratórios 18 a 24 horas após a infecção, quando infectadas por via aerógena (CAVANAGH, 2007).

Atualmente, a BIG é endêmica em todas as regiões do mundo onde se exerce a avicultura industrial sendo, juntamente com a Doença de Newcastle e a Influenza Aviária, considerada como uma das doenças que mais causa prejuízos à avicultura industrial de galinhas e frangos no Brasil e no mundo (OIE, 2013). No Brasil, a BIG é a principal doença respiratória avícola e tem sido registrada com grande frequência na Serra Gaúcha, Oeste de Santa Catarina, Sudoeste, Oeste e Norte do Paraná, além do Sul e Norte de São Paulo e Triângulo Mineiro (ASSAYAG, 2004; MONTASSIER et al., 2010). O controle dessa enfermidade é extremamente difícil devido à existência de múltiplos sorotipos e variantes do vírus, que podem não responder à proteção cruzada quando outros patótipos estão envolvidos (CAVANAGH; NAQI, 2003; LIU et al., 2009).

Naturalmente, o vírus infecta aves *Gallus gallus domesticus* de todas as idades. No entanto, inúmeros relatos foram feitos sobre o isolamento de coronavírus geneticamente similares ao IBV em outras espécies de aves, galiformes ou não (CAVANAGH et al., 2001). Galinhas eram consideradas as únicas hospedeiras naturais do IBV até Cavanagh et al. (2002) observarem um marcado grau de semelhança entre as espécies virais que infectam galinhas, perus e faisões, e assim, tornarem público à comunidade científica que o IBV também pode infectar perus e faisões. Além da identificação do IBV como agente da BIG, a detecção e a caracterização de novos coronavírus aviários foram notificadas em perus com quadro clínico de enterite e mortalidade elevada, e em faisões acometidos por doença respiratória e renal (GUY, 2000; CAVANGH et al., 2002).

A maior parte do conhecimento a respeito dos coronavírus das aves se baseia no IBV. Essa espécie viral possui uma vasta variedade de estirpes virais distintas geneticamente, cujas lesões são dependentes da estirpe envolvida, o que incorre em uma predileção variada de tecidos alvos por esse vírus (CAVANAGH, 2005). A infecção

pelo IBV ocorre via trato respiratório e a traqueia é o alvo primário de replicação. A transmissão do IBV ocorre pelo contato direto ou indireto entre a ave doente, ou mesmo infectada e assintomática, e as aves saudáveis, sendo o tecido epitelial do trato respiratório superior infectado primeiramente. Aves de todas as idades são susceptíveis, embora a doença seja mais severa em aves jovens, nas quais esse vírus pode causar índices de mortalidade significativos (LIU et al., 2001; CAVANAGH e NAQI, 2003).

O IBV invade e se replica em células ciliadas e produtoras de muco do trato respiratório superior, onde, o título infectante viral atinge valores máximos nas mucosas das narinas e da traqueia ao terceiro dia após a infecção, permanecendo elevado por mais dois ou cinco dias. Com relação à capacidade de infectar outros órgãos do sistema respiratório, estudos indicaram títulos virais similarmemente elevados em pulmões e sacos aéreos (CAVANAGH, 2007). Apesar da nomenclatura do IBV sugerir tratar-se de um patógeno restrito ao trato respiratório, esse vírus, além de se replicar e causar sérias lesões em tecidos e órgãos desse sistema, que são sua porta de entrada, apresenta também, tropismo e patogenicidade para muitos outros tipos de células epiteliais (CAVANAGH, 2005; CAVANAGH, 2007).

A BIG se manifesta sob quatro formas clínicas e anatomopatológicas diferentes. Geralmente, a infecção provoca lesões no trato respiratório superior, atingindo pulmões e sacos aéreos, as quais se associam e são exacerbadas por infecções bacterianas secundárias (CAVANAGH, 2005; CAVANAGH, 2007). Em aves acometidas nas primeiras semanas de vida, os sintomas respiratórios são mais comuns e caracterizam-se por espirros e estertores úmidos da traqueia, morbidade e mortalidade elevadas. Na fase reprodutiva, a enfermidade ocasiona queda de postura em torno de 5% a 30% de ovos defeituosos, sem, no entanto, observar mortalidade significativa (CAVANAGH, 2005). Nos frangos de corte, pode ocorrer sob a forma da Síndrome Nefrite-Nefrose, havendo aumento acentuado dos rins, diarreia aquosa e morbidade e mortalidade variáveis (5% a 20%). Ainda, em poedeiras e reprodutoras, durante a fase de recria, pode haver manifestação tardia de urolitíase e completa atrofia renal, com morbidade e mortalidade variáveis (2% a 10%) (CAVANAGH; NAQI, 2003).

Em geral, o tropismo viral é por células do trato respiratório, gastrointestinal e, possivelmente, por células neuronais (WEVERS e VAN DER HOEK, 2009).

Independente do tecido de origem, isolados de IBV infectam, a princípio, células ciliadas do epitélio que reveste a mucosa do aparelho respiratório, principalmente da traqueia, que é o órgão de eleição para multiplicação viral. Em consequência, o vírus causa lesões características na traqueia e, por isso, a doença é considerada primária ou típica do aparelho respiratório (CAVANAGH, 2007; FERNANDO et al., 2010). As principais alterações e lesões causadas pelo IBV no tecido do trato respiratório incluem deciliação do epitélio traqueal e bloqueios da produção e da secreção de muco pelas células caliciformes locais, o que favorecem sobremaneira a instalação de infecções secundárias por bactérias oportunistas, como *Escherichia coli* e também *Mycoplasma* (WITT et al., 2010).

Em contrapartida, algumas cepas virais são predominantemente nefropatogênicas, apresentando predileção exacerbada para os rins e aparelhos reprodutor e digestório. Cepas, como a T ou N1/N62, afetam o trato urogenital de frangos causando doença renal. Adicionalmente, urolitíase, miopatia peitoral e epididimite foram descritas em reprodutores pesadas e em galinhas de postura imunizadas com vacina tipo Massachusetts. As vacinas com essa cepa possuem maior tropismo por células da traqueia, pulmão, intestino e rim do que as com a cepa H120, que tem maior afinidade por células do intestino e traqueia, porém não protegem as células renais e pulmonares (PEREIRA et al., 2006; WICKRAMASINGHE et al., 2011).

As infecções pelo IBV podem ser diagnosticadas pela detecção ou elevação no título de anticorpos anti-antígenos específicos aos vírus. Geralmente e com a finalidade de se correlacionar um problema clínico sugestivo da infecção com o IBV, é necessário que amostras de soros sejam ensaiadas pareadamente, sendo que a primeira amostra deve ser colhida na fase inicial da doença e a segunda amostra, posteriormente, entre a segunda e a quarta semana pós-sintomas. Um aumento de quatro vezes no título de anticorpos é indicativo de soroconversão e da presença de infecção pelo IBV (DE WIT, 2000).

O diagnóstico laboratorial da BIG depende de técnicas diretas envolvendo o isolamento e identificação genômica ou fenotípica do vírus. A técnica convencional para diagnosticar o IBV consiste no Isolamento Viral em ovos embrionados livres de patógenos específicos (SPF, do inglês *Specific Pathogen Free*) ou em culturas

celulares, seguido da identificação pelo teste de Soroneutralização (DI FÁBIO et al., 2000). Geralmente, três ou mais passagens virais em ovos embrionados de galinha são necessárias para o isolamento primário do IBV, o que torna esses procedimentos dispendiosos e demorados. A realização de várias passagens permite um aumento na concentração viral antes da realização de métodos para detecção do agente, favorecendo o processo. Assim, a série de passagens confere uma adaptação a algumas amostras de IBV, que tornam a replicação viral e o efeito citopático mais efetivos (DE WIT et al., 2000). O isolamento do IBV em cultura de células traqueais de aves também é bastante sensível, no entanto, é um método muito laborioso e demorado. Portanto, os métodos convencionais para o diagnóstico do IBV, baseados no isolamento viral em ovos embrionados ou em cultura de órgão traqueal, seguidos da técnica de Virusneutralização, geralmente, são procedimentos onerosos e muito demorados (DI FÁBIO; ROSSINI, 2000).

Outros métodos diagnósticos diretos incluem microscopia eletrônica, feita após a concentração do vírus por ultracentrifugação, testes com anticorpos fluorescentes em membrana corion-alantoide de ovos embrionados infectados, Imunodifusão em Gel de Ágar e Imunofluorescência (DE WIT et al., 2000; DI FÁBIO et al., 2000). A Imunofluorescência pode ser empregada na detecção de IBV em ovos embrionados, cultura de células e anéis traqueais, utilizando soro com anticorpos policlonais ou anticorpos monoclonais. Alternativamente, o IBV ainda pode ser detectado de forma direta por Imunohistoquímica em tecidos de aves infectadas ou pela técnica de Hibridização *In Situ*, auxiliada por sondas de oligonucleotídeos, que podem detectar diretamente o IBV em tecido de aves infectadas (DI FÁBIO; ROSSINI, 2000).

A detecção de anticorpos específicos para o IBV, ou seja, produzidos pelos organismos hospedeiros infectados, é feita por métodos sorológicos ou indiretos. O diagnóstico sorológico de infecções por IBV é uma alternativa mais rápida para monitoramento de lotes comerciais e definição de medidas de biossegurança (CARDOSO et al., 2001; MUÑIZ et al., 2000). Sorologicamente, a infecção por IBV é detectada em aves pela demonstração de soroconversão, utilizando soros pareados ou pela presença de Imunoglobulina M específica (DE WIT et al., 2000). A detecção dos anticorpos no soro dos animais infectados é possível a partir de uma semana após a

exposição ao vírus, podendo se prolongar por 20 a 90 dias. Sendo assim, a ocorrência de resultados negativos pode ser atribuída ao fato de aves não apresentarem anticorpos circulantes no momento da colheita ou não ter tempo hábil para o início da resposta humoral (DI FÁBIO; ROSSINI, 2000; DI FÁBIO et al., 2000).

Os exames sorológicos mais utilizados para a BIG são o ELISA indireto, Virusneutralização e Inibição de Hemaglutinação. Esses ensaios podem ser usados para monitorar a grande variabilidade que ocorre entre as estirpes do IBV, possibilitando a classificação das mesmas em diferentes sorotipos (DE WIT et al., 2000). Indesejavelmente, podem ser observados o desenvolvimento de reações inespecíficas, baixa sensibilidade e subjetividade na análise dos resultados, além da impossibilidade de discriminação das diferentes cepas do IBV nas reações imunoenzimáticas. No caso de aves imunizadas, a realização dessas técnicas após a imunização permite a avaliação de programas de vacinação e, concomitantemente, a elaboração de estratégias de controle da doença (MUÑIZ et al., 2000; CARDOSO et al., 2001).

Com o advento das técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) observou-se uma melhoria significativa da sensibilidade e especificidade do diagnóstico etiológico da BIG. A PCR auxilia estudos de caracterização e epidemiologia molecular, utilizando *primers* para amplificação de genes que codificam, por exemplo, a proteína S. Porém, o uso de *primers* voltados para regiões conservadas agiliza o processo de detecção do agente, quando o mesmo está em pequena quantidade na amostra. A técnica de reação em cadeia de polimerase após a extração do RNA viral e transcriptase reversa tem sido empregada na identificação de genótipos de IBV, como um meio rápido, sensível e específico (DI FÁBIO; ROSSINI, 2000; BOUROGÂA et al., 2009).

As medidas que têm sido mais adotadas para o controle da BIG fundamentam-se na combinação de abordagens higiênico-sanitárias, juntamente com programas imunoproláticos, de acordo com as particularidades de cada região e tipo e idade das aves (CAVANAGH, 2007). A doença pode ser prevenida por vacinação de frangos com vírus vivos atenuados administrados localmente por via intranasal ou intraocular, mas

não sistemicamente. O uso de IBV inativado juntamente com adjuvante proporciona maior proteção contra a doença (WANG et al., 2006).

No Brasil, apesar de existirem vacinas, grandes obstáculos persistem para se estabelecer uma condição de controle mais efetivo da infecção pelo IBV nos plantéis avícolas comerciais brasileiros, o que parece ser agravado pela utilização de apenas um sorotipo viral, Massachusetts, nas vacinas vivas atenuadas (DI FABIO; ROSSINI, 2000; MONTASSIER, 2010). Deve-se salientar que as maiores dificuldades, nesse caso, estão mais diretamente relacionadas ao aparecimento, entre essas populações de aves, de novos sorotipos ou variantes do IBV, que são genética e antigenicamente distintos das estirpes selvagens e vacinais. Em decorrência disso, no mundo todo e, inclusive no Brasil, tem sido crescente a identificação de variantes genéticas e antigênicas do vírus, tornando muito difícil o controle da infecção e, conseqüentemente, da enfermidade por esse vírus (MONTASSIER, 2010).

3.3 Respostas Imunes do *Gallus gallus domesticus* ao IBV

3.3.1 O Sistema Imunológico do *Gallus gallus domesticus*: Noções Gerais

O sistema imunológico de organismos multicelulares possui como função fisiológica o reconhecimento de padrões “próprios” e “não-próprios”, defendendo os organismos de ameaças externas ou internas (ABBAS et al., 2008). Além da existência de barreiras externas, este sistema de proteção é constituído por duas linhas de defesa: a imunidade inata e a imunidade adaptativa. Estas duas linhas de defesa compreendem diferentes células, sítios de origem e mecanismos efetores. No entanto, elas se comunicam entre si por meio de moléculas e receptores, e as duas são essenciais para o bom funcionamento do organismo (JANEWAY, 2000).

O sistema imune das aves possui diversas semelhanças aos dos mamíferos, porém, apresentam características únicas. Devido ao curto período de criação e importância econômica, muitas pesquisas para avaliação das características imunológicas em aves, utilizam como modelo a espécie *Gallus gallus domesticus*

(DAVISON, 2008; BROWNLIE; ALLAN, 2011; TIZARD, 2014), embora patos também sejam amplamente utilizados (DAVISON, 2008; BROWNLIE; ALLAN, 2011).

O sistema imune das aves é constituído por vários mecanismos de defesa contra microrganismos, como barreiras físicas, químicas e biológicas, tais como a pele e a mucosa; citocinas, peptídeos antimicrobianos, os componentes do sistema complemento, células (linfócitos, macrófagos, heterófilos e células dendríticas), além de tecidos e órgãos linfoides (ABBAS et al., 2008; ERF, 2008). Leucócitos, trombócitos e eritrócitos são produzidos na medula óssea, onde sofrem o processo de desenvolvimento e maturação e migram para a circulação sistêmica, para os tecidos e órgãos linfoides secundários (MACARI et al., 2002; CAMPBELL, 2004).

A diferença entre o sistema imune das aves e outras espécies é bem definida e clara, devido à precocidade de formação e maturação das células desse sistema nas aves, uma vez que as células da resposta adquirida são provenientes de órgãos imunes primários, como o timo e a Bursa de Fabrício. A receptividade do timo embrionário, por volta dos seis dias de incubação, e da bursa, por volta dos dez, permite a formação dos linfócitos, que na vida embrionária são morfologicamente iguais aos das aves pós-nascimento, mas que ainda têm funcionalidade limitada (CARON, 2008). O influxo de células-tronco na Bursa de Fabrício ocorre entre 8º e 14º dia do desenvolvimento embrionário, a proliferação dessas células se inicia ao 12º dia e continua por várias semanas após a eclosão, enquanto a emigração das células maduras começa a partir do 18º dia do período embrionário (SCOTT, 2004).

Uma diferença marcante entre os pulmões das aves e dos mamíferos é a falta de linfonodos e macrófagos residentes no trato respiratório das aves, o que requer um influxo de células fagocíticas para iniciar a defesa contra agentes infecciosos (QURESHI et al., 2000; FUNG e LIU, 2014). Além disso, em galinhas, não é conhecido quais tipos de células são responsáveis pela iniciação ou ativação de células T virgens e se existe uma distinção funcional entre macrófagos e células dendríticas na capacidade dessa ativação inicial (GEISSMANN et al., 2010).

A resposta imune das aves pode ser dividida em resposta imune inata, que representa a primeira linha de defesa de um organismo após o rompimento das barreiras físicas, químicas e biológicas iniciais; e a resposta imune adaptativa, passiva

ou ativa (ERF, 2008). Os primeiros sítios de desafio antigênico nas aves são as mucosas, especialmente as do trato digestório e respiratório. Esses sítios possuem tecidos linfoides especiais associados a mucosas, denominados tecidos linfoides associados ao intestino (GALT, do inglês *Gut Associated Lymphoid Tissues*) e tecidos linfoides associados aos brônquios (BALT, do inglês *Bronchio Associated Lymphoid Tissues*), nos quais são geradas as respostas imunes humorais e celulares para a proteção das superfícies mucosas (CARON, 2008).

Nas aves, a resposta imune inata envolve a participação de células fagocíticas, moléculas do sistema complemento e anticorpos naturais, entre outras moléculas, além de células não linfoides (ERF, 2008; FUNG; LIU, 2014). Por outro lado, a resposta imune adaptativa é o resultado da cooperação entre linfócitos T e B, células apresentadoras de antígenos e anticorpos específicos, e tem duas propriedades básicas: a especificidade e a memória imunológica (QURESHI et al., 2000; ABBAS et al., 2008). Deficiências imunitárias, sejam da imunidade inata (disfunções de células fagocitárias e deficiência do sistema complemento) ou da imunidade adaptativa (deficiência de produção de imunoglobulinas ou deficiência da função de células T), são fortemente associadas com aumento de susceptibilidade a infecções (JANEWAY, 2001).

A especificidade desse sistema é a capacidade da molécula de anticorpo e dos receptores de membrana dos linfócitos T se ligarem ao antígeno específico. Enquanto a memória imunológica é um fenômeno relacionado à expansão clonal, ocorrendo a diferenciação de células, efectoras e de memória, a partir de um linfócito B ou T específico para um antígeno. As células de memória são células clones que têm a mesma especificidade do linfócito B e T do qual são originadas. Uma das parcelas das células clones gerada na resposta imune primária se diferenciam e atuam na fase de eliminação do antígeno, e a segunda parcela das células clonais fica em estado de estase, como células de memória, sendo cruciais para a resposta a um segundo estímulo antigênico gerado pelo antígeno específico, sendo o princípio básico da resposta às vacinas (JANEWAY, 2000; ABBAS et al., 2008).

3.3.2 Resposta Imune Inata do *Gallus gallus domesticus* ao IBV

A imunidade do hospedeiro contra infecções víricas depende da atuação integrada da resposta imune inata e da adquirida. Na fase inicial das infecções virais, cuja reponsabilidade é da imunidade inata, o controle é feito pelos macrófagos, interferons tipo I e pelas células *Natural Killers* (NK) (GEISSMANN et al., 2010). Os mecanismos envolvidos na resposta imune inata atuam imediatamente após o contato do hospedeiro com os antígenos virais, não possuem capacidade de discriminação entre os vírus e não necessitam de exposição prévia para serem desencadeados. Apesar de pouco estudado, o sistema imune inato é de grande importância para ativação do sistema imune adaptativo (PALM; MEDZHITOV, 2009).

A resposta imune inata, também denominada natural ou inespecífica, é mediada por células e moléculas (FLORES, 2012). Classicamente, essa resposta destaca-se como a primeira linha de defesa mediante um desafio infeccioso e compreende células e sistemas de moléculas solúveis. As principais células que fazem parte do sistema imune inato são os leucócitos, apesar de que, muitos outros tipos celulares expressam moléculas associadas a essa resposta imune. Estas células são classificadas segundo a sua morfologia, como, por exemplo, pelo número de segmentos em que seu núcleo se divide e se existe a presença ou não de grânulos citoplasmáticos (ABBAS et al., 2008; GEUS; VERVELDE, 2013).

As infecções víricas estimulam uma intrincada rede de informações químicas e celulares que visam maximizar o mecanismo imunológico mais efetivo contra a maioria dos vírus. A divisão entre a resposta imune inata e adquirida não é absoluta, e essas duas formas de resposta estão interligadas, atuando conjuntamente no combate aos agentes agressores. Os principais protagonistas da conexão entre essas respostas são os macrófagos (FLORES, 2012). Essas células são membros do sistema mononuclear fagocítico, que circulam pelos tecidos periféricos e são dotadas de uma grande capacidade de reconhecer os mais variados tipos de microrganismos. Após reconhecimento e captura desses microrganismos, os macrófagos se dirigem aos órgãos linfoides secundários, onde estimulam as células linfoides, que são os principais protagonistas da resposta imune específica (GEUS; VERVELDE, 2013).

Macrófagos são fagócitos residentes em tecidos linfoides e não linfoides e acredita-se que eles estejam envolvidos na homeostase dos tecidos, na remoção de células apoptóticas e na produção de fatores de crescimento. Eles possuem uma grande variedade de receptores para o reconhecimento de patógenos, o que faz dessa célula um importante fagócito e indutor da produção de mediadores da inflamação (GORDON, 2002). Os macrófagos têm a capacidade de internalizar microrganismos e outras moléculas que, através de endossomos, um sistema de organelas de membrana contendo proteases e baixo pH, eliminam estes microrganismos e moléculas internalizadas. Presentes em todo corpo das aves, os macrófagos desempenham diferentes e importantes funções na imunidade inata, como a fagocitose e a secreção de citocinas e quimiocinas, que contêm a infecção e aumentam a regulação imune, respectivamente (TWIGG et al, 2004; TAYLOR et al., 2005).

As células efectoras da imunidade inata das aves são macrófagos, heterófilos, células dendríticas e células NK, sendo a fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento, bem como síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas, os principais mecanismos na imunidade inata (LOHARUNGSIKUL et al., 2008). Esses mecanismos são ativados por estímulos específicos, representados por estruturas moleculares de ocorrência ubíqua em microrganismos, mas que não ocorrem na espécie humana. Substâncias como manose, lipopolissacarídeo e ácido teicoico são comumente encontradas na superfície de microrganismos e, por isso, constituem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), que ativam a resposta imune inata, por interação com diferentes receptores, conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *Patterns Recognition Receptors*), dentre os quais está a família dos receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês *Toll-Like Receptors*) (ABBAS, 2008; LOHARUNGSIKUL et al., 2008).

O fato de que os macrófagos expressam, em sua membrana, receptores como TLRs, que se ligam especificamente a padrões moleculares existentes em diversos agentes infectantes, torna questionável denominar inespecífica a resposta imune inata (MACHADO et al., 2004). Estudos dos TLRs têm permitido grandes avanços na compreensão dos mecanismos de defesa do hospedeiro frente à invasão por diferentes

microrganismos (KJAERUP et al., 2014). Os TLRs se destacam pelo seu papel central na ligação a patógenos e pela iniciação da resposta inflamatória. Esses receptores são expressos em uma variedade de células do sistema imune, tais como, monócitos, macrófagos, células dendríticas, células B, bem como em outros tipos celulares que não estão envolvidos diretamente na defesa do hospedeiro (HALLMAN et al., 2001; TAKEUCHI; AKIRA, 2009).

Os produtos derivados da ativação de macrófagos constituem proteínas importantes na mediação do processo inflamatório (GORDON et al., 2003). Os PRRs de macrófagos, quando ativados pelos PAMPs, geram uma cascata de sinalização intracelular com recrutamento de proteínas cinases que ativam fatores de transcrição nuclear. Esses fatores estimulam a expressão gênica de citocinas, proteínas sinalizadoras que regulam mecanismos imunológicos, e também de enzimas, como a ciclooxigenase 2 e a óxido nítrico sintase induzida, envolvidas em processos infecciosos e inflamatórios (OOI et al., 2010). Após a ligação dos PAMPs aos PRRs, ocorre a estimulação da produção de citocinas, proteínas e peptídeos com atividade antimicrobiana, que regulam a resposta da imunidade inata como a opsonização pelas proteínas do sistema complemento e o processo de fagocitose pelos heterófilos e macrófagos (KAISER, 2010).

O sistema imune inato não é tão eficiente quanto o sistema adaptativo, porém as suas células possuem PRRs que podem ativar uma discreta resposta imunológica (KUMAR et al., 2009). Os macrófagos reconhecem os vírus baseados nos PAMPs, por PRRs, incluindo os TLRs, CD14, receptores de lectina de tipo C e receptores do tipo ácido retinóico (GEUS; VERVELDE, 2013). Os macrófagos possuem PRRs, nos quais se ligam PAMPs, como a manose, que ativa uma série de cascatas de sinalização (AKTAN, 2004). A ativação desses receptores pode levar ao aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, de enzimas que irão induzir a produção de espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico ou mesmo que sintetizam eicosanóides, como a enzima COX-2 (CUZZOCREA et al., 2000).

Outros mediadores importantes da imunidade inata em infecções virais são os Interferons do tipo I (IFN-I), que são produzidos por células infectadas por vírus e, ao interagir com uma célula não infectada, têm a capacidade de protegê-la contra a

infecção, além de colaborar com a imunidade adquirida. O IFN-gama também atua contra as infecções virais mediante a ativação dos macrófagos com destruição dos vírus e também das células NK (células citotóxicas naturais), as quais, pela liberação de granzima e perforina, destroem as células infectadas pelos vírus. Ademais, a IL-12 possui participação importante na fase inicial, sendo produzida por macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos, estimulando as células NK a exercer citotoxicidade e a produzir mais IFN-gama, que por sua vez aumenta o potencial proteolítico dos macrófagos (MACHADO et al., 2004).

Durante uma infecção primária pelo IBV, as respostas imunitárias inatas são induzidas pela ligação dos virions aos PRRs presentes nas células epiteliais da mucosa traqueal, especialmente, os receptores TLRs (ABD EL et al., 2009). Estudos recentes apontam que essa ligação é dependente de ácido siálico e que receptores homólogos ao de seres humanos, como DCSIGN ou L-SIGN, também fazem parte do complexo de receptores para o IBV em galinhas. Receptores TLR, especialmente, TLR3, TLR6 e TLR7 podem iniciar a resposta imune inata da traqueia local após o reconhecimento do IBV (KJAERUP et al., 2014).

A infecção por IBV induz respostas imunitárias amplas em galinhas, mas a extensão da resposta imunitária varia dependendo da estirpe IBV, da via de infecção e dos tecidos infectados. Uma vez que o PAMP viral, a manose, se liga ao receptor lectina do macrófago, os eventos iniciais na resposta imune à infecção pelo IBV são deflagrados, os quais envolvem a opsonização de virions livres, pela ativação do complemento nos locais da mucosa, ou por inibição da entrada do vírus por receptores dependentes de ácido siálico (GUO et al., 2008). Estudos apontam que a ligação entre o receptor lectina e a manose ocorre localmente na mucosa traqueal e está envolvida na regulação da resposta imunitária adaptativa celular após uma infecção por IBV. No entanto, não parece influenciar a resposta imune humoral após uma infecção pelo vírus (KJAERUP et al., 2014).

Em hospedeiros infectados pelo IBV, as células mononucleares são infectadas após as células alvo primárias, ou seja, as células epiteliais ciliadas respiratórias. Por atuarem após a infecção, os macrófagos são fundamentais na resposta imune do hospedeiro ao vírus e, portanto, à patogênese viral (KAUFMANN et al., 2001; XING et

al., 2008). Estudos demonstraram que macrófagos de galinha são suscetíveis à infecção por IBV e que as infecções podem modular especificamente as respostas imunes adaptativas de hospedeiros de espécies aviárias (XING et al., 2008).

As espécies aviárias dispõem de um mecanismo de recrutamento de uma rede de macrófagos em seu trato respiratório superior, estrategicamente, localizada para captar antígenos infecciosos (DE GEUS et al., 2012). Isso sugere que os fagócitos mononucleares de galinhas podem reagir a infecções respiratórias por vírus, tão logo a sua emigração para o local de infecção (VERVELDE et al., 2013). Macrófagos de aves da linhagem celular HD11 são viralmente transformados. Trata-se de um vírus da mielocitomatose de aves transformado em macrófagos de galinha, que tem sido caracterizado por expressar fortemente receptores para porção Fc de imunoglobulinas, capacidade fagocítica e antígenos de superfície celular de macrófagos (BEUG et al., 1979). Células HD11 têm sido usadas em estudos *in vitro* de funções imunes de macrófagos de galinha (LILLEHOJ; LI, 2004; HE et al., 2011).

Poucos estudos têm abordado a captação de partículas por células do trato respiratório em galinhas (REEMERS et al., 2010). As principais diferenças imunológicas entre mamíferos e aves são a ausência de gânglios linfáticos drenantes, alvéolos e macrófagos alveolares nos pulmões aviários. O trato respiratório de galinhas contém menos macrófagos residentes livres do que o de mamíferos. Nas espécies aviárias, no entanto, uma ampla rede de macrófagos é mobilizada para a mucosa das vias aéreas superiores, revestimentos de parabrônquios e tecidos conjuntivos (MAINA, 2002). Em geral, devido à falta de macrófagos livres residentes no trato respiratório nas aves, espera-se que as aves dependam fortemente do afluxo de fagócitos na sua defesa contra agentes infecciosos (REESE et al., 2006).

O sistema imunológico evoluiu, criando mecanismos que agem complementando a imunidade inata, mas com a capacidade de se adaptar ao tipo de agente infeccioso, ao longo da vida do hospedeiro. Os mecanismos imunológicos específicos contra as infecções víricas são desencadeados após a estimulação direta ou indireta dos linfócitos T e B pelos antígenos virais e possuem como características principais: especificidade, diversidade e memória imunológica, ou seja, a capacidade de produzir

uma resposta qualitativa e quantitativamente diferente em exposições subsequentes a um determinado antígeno (FLORES, 2012).

3.3.3 *Resposta Imune Adaptativa do Gallus gallus domesticus ao IBV*

A Imunidade adaptativa é, também, conhecida como específica ou adquirida. Os mecanismos envolvidos na resposta imune adaptativa desenvolvem-se sequencialmente aos inatos, porém, de forma mais lenta e sincronizada, resultando na indução de células e moléculas efetoras, que irão combater o agente, e células de memória, que possuem vida longa e que serão mais rápida e efetivamente reestimuladas em exposições subsequentes ao mesmo agente (FLORES, 2012).

A imunidade adquirida resulta da ativação de mecanismos efetores entre antígenos e anticorpos, incluindo células B e células T, que resulta em uma maior ativação de macrófagos e produção de células B e T de memória (ABBAS, 2008). Nas aves, a diferenciação dos linfócitos B ocorre na Bursa de Fabrícus. Os linfócitos B podem reconhecer antígenos por meio das imunoglobulinas de membrana, semelhante ao que ocorre em mamíferos (CHACANA et al., 2004). A imunidade adaptativa humoral tem como principal molécula efetora o anticorpo. A resposta imune adaptativa inicia-se com a apresentação de antígenos pelas células apresentadoras de antígenos que capturam microrganismos e os apresentam aos linfócitos T, que são capazes de reconhecer antígenos, por meio do complexo principal de histocompatibilidade presente nas membranas das células apresentadoras de antígenos (ABBAS, 2008; KAISER, 2010).

A imunidade adquirida específica contra os vírus ocorre com ativação de células T CD8+ que vão produzir citotoxicidade pelo reconhecimento de antígenos virais via complexo principal de histocompatibilidade de classe I nas células alvo, e consequente liberação de granzima e de perforinas com lise das células infectadas e também dos vírus. Durante o mecanismo adaptativo, também ocorre ativação das células T CD4+, que vão colaborar com as células B na produção de anticorpos. Os anticorpos têm papel relevante no combate às infecções virais. Os vírus são microrganismos intracelulares obrigatórios, no entanto, por ocasião da propagação da infecção, seguida

da multiplicação e lise das células infectadas, ficam livres até a penetração em outra célula. Nessa fase extracelular os anticorpos podem se ligar aos vírus e, por meio do mecanismo de opsonização, impedir que eles propaguem a infecção. Em outra via, os anticorpos podem ser adjuvantes no mecanismo de citotoxicidade celular dependente de anticorpos, ao se ligarem às células infectadas, permitindo a ação das células NK (MACHADO et al., 2004).

A imunidade adaptativa humoral tem como principal molécula efetora o anticorpo. Na resposta imune humoral, os anticorpos são secretados por plasmócitos derivados de linfócitos B, após o contato com os antígenos. Além disso, a produção de anticorpos é dependente da natureza dos antígenos (CARDOSO; TESSARI, 2015). Como resposta ao reconhecimento do antígeno, estimula-se a proliferação e a ativação de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, e dependendo do microambiente em que estão, os linfócitos T irão se diferenciar em subpopulações denominadas T helper 1 (Th1) e 2 (Th2). Linfócitos Th1 estimulam as células T CD8⁺, células NK e macrófagos, enquanto que os linfócitos Th2 estimulam os heterófilos e linfócitos B a atuarem sobre os patógenos (ABBAS, 2008; KAISER, 2010).

Assim, existe uma interrelação entre a imunidade inata e a imunidade específica. Os macrófagos liberam citocinas que ativam os linfócitos T em resposta a um estímulo inflamatório e, do mesmo modo, os linfócitos T são capazes de liberar citocinas que ativam os macrófagos (MORGULIS, 2002). A estimulação dos linfócitos B pelos linfócitos Th2, somado a um microambiente específico, composto por citocinas diversas, promovem a diferenciação dos plasmócitos e a produção de imunoglobulinas específicas. As citocinas que estimulam a resposta imune humoral são IL-4, IL-5, IL-10 e o fator de crescimento transformador do tipo β (TGF, do inglês *Transforming Growth Factor*) (SCOTT, 2004). Nas aves, a interleucina 6 (IL-6) é responsável pela diferenciação das células B em plasmócitos secretores de anticorpos. As citocinas IL-5 e IL-15 foram identificadas em aves e também atuam na resposta humoral na diferenciação das células B nos GALTs (RATCLIFFE, 2002).

As imunoglobulinas (Ig) se constituem em elementos essenciais para a proteção específica contra patógenos. As imunoglobulinas das aves são glicoproteínas sintetizadas por células B e plasmócitos, e são divididas em três isotipos ou classes:

IgM, IgA e IgY (CHACANA et al., 2004; ERF, 2008). As imunoglobulinas produzidas em resposta à exposição ao IBV são a IgM, IgA e IgY. A IgA, presente cinco dias após contato com o vírus, está associada à proteção local dos tecidos, principalmente na mucosa ocular, intestino e trato respiratório das aves. A IgM aparece após quatro a cinco dias depois da exposição ao vírus e desaparece entre 10 a 12 dias. A IgG também é detectada após cinco dias de infecção, atingindo o pico entre 21 e 25 dias, com conseguinte redução gradativa de titulação (CARON, 2010).

O isotipo IgA é o principal anticorpo presente nas mucosas, sendo produzido pelos plasmócitos presentes nas placas de Peyer e nos tecidos linfóides associados à mucosa (MALTs, do inglês *Mucosal Lymphoid Tissues*) presentes nas tonsilas cecais. A IgM ocorre na fase aguda, ou seja, é a primeira imunoglobulina a aparecer após um estímulo antigênico, sendo produzidas durante a resposta imune primária e secretadas em forma de pentâmero e expressas também na forma de receptores de membrana plasmática dos linfócitos B (KUMAR et al., 2009). As IgY são imunoglobulinas sistêmicas, produzidas após a resposta imune secundária, com função de opsonização e são caracterizadas como imunoglobulinas de fase crônica, que aparecem posteriormente. As IgY são mais específicas e equivalem a 75% do total das imunoglobulinas presentes no soro sanguíneo (TIZARD, 2010). Estão predominantemente presentes no soro e são responsáveis pela defesa contra infecções sistêmicas e pelas reações anafiláticas em aves (MACARI et al., 2002). Isotipos IgY, cuja nomenclatura refere-se à gema do ovo (Y, do inglês *yolk*), são funcionalmente similares às IgGs (só que presente no ovo) e IgE dos mamíferos, com baixa massa molecular. Estudos mostraram diferenças na massa molecular das cadeias pesadas da IgY, que apresenta massa molecular de aproximadamente 67.500 daltons, enquanto a IgG dos mamíferos tem cerca de 50.000 daltons (VIERTLBOECK; GOBEL, 2008; KUMAR et al., 2009). A proteção imune passiva, via anticorpos maternos, especialmente por IgY, transmitida pela matriz aos pintos através do ovo, garante a resposta aos desafios externo nos estágios iniciais de vida (CARON, 2010).

A maior especificidade dos anticorpos IgY depende da interação dos linfócitos B com linfócitos Th CD4+, que atuam no sentido de promover a maturação da afinidade desses anticorpos. A interação entre linfócitos B e Th CD4+ é também verificada na

produção de anticorpos com maior especificidade do isotipo IgA. As interações entre linfócitos B e T promovem alterações genômicas no linfócito B, que permitem o surgimento da IgY ou da IgA, e também a formação de células B de memória para a produção de anticorpos mais específicos dos isotipos IgY e IgA, como resultado da vacinação, por exemplo; permitindo a geração de respostas com maiores intensidade e afinidade de anticorpos pelo mesmo antígeno em uma próxima exposição (CARON, 2008).

Vacinas vivas atenuadas são fundamentais para que os tecidos linfoides associados às mucosas sejam mais efetivamente estimulados. Além disso, há de se considerar a maior segurança do uso das 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+, já que as vacinas inativadas tendem a gerar maiores títulos de anticorpos do que as vacinas vivas atenuadas. Nesse sentido, é importante destacar que, em média, uma ave produz 100 miligramas de IgA por quilo de peso ao dia, comparada a produção de 30mg de IgY por quilo de peso ao dia, o que aponta para a importância da vacinação via mucosa para patógenos cuja porta de entrada é por meio desse tipo de epitélio. Nas aves, a prática de imunização com vacinas na mucosa respiratória local é muito comum devido à praticidade, com maior facilidade na administração do que por vias parenterais, que requerem a injeção individual das vacinas (CARON, 2008, CARON, 2010).

A imunidade humoral do hospedeiro na traqueia após a imunização intranasal de frangos utilizando estirpe Massachusetts de IBV atenuado ou não atenuado tem sido objeto de estudo. Estes mostraram um aumento na expressão de RNAm de TLR2, TLR3, TLR6, TLR7, IL-1 β e genes envolvidos na sinalização de interferons, entre vários outros, após a imunização com IBV. Não se sabe, porém, se as respostas do hospedeiro são provocadas contra qualquer estirpe de IBV no pulmão, embora seja, também, um órgão alvo do IBV (GUO et al., 2008). A natureza e a extensão da resposta inata do hospedeiro provocada contra estirpes virulentas de IBV na traqueia e no pulmão também não são conhecidas. Foi demonstrado que, após imunização com a

estirpe de Mass do IBV, o número de macrófagos no líquido de lavagem broncoalveolar é aumentado. Contudo, não se sabe se estes macrófagos são mobilizados a partir da traqueia, do pulmão ou de ambos os tecidos em resposta à infecção por IBV (WANG et al., 2006).

Ainda no tocante à resposta imunológica das aves frente ao IBV, torna-se evidente que qualquer estratégia vacinal que induza proteção contra diversas estirpes sorologicamente distintas de IBV seria bem-vinda. As respostas imunes humorais, avaliadas usualmente pela mensuração de anticorpos específicos contra epítomos do IBV já estão bem conhecidas (GUO et al., 2008). A resposta imune humoral de aves frente à vacinação contra o IBV, comumente, é avaliada pela mensuração dos níveis de anticorpos no soro sanguíneo, mediante as técnicas de ELISA, Virusneutralização ou Inibição da Hemaglutinação, cujas magnitudes, em geral, apresentam pouca correlação com o estado de proteção à infecção pelo IBV, devido aos inúmeros sorotipos virais existentes. No entanto, de acordo com Cavanagh (2007), há uma carência de estudos referentes à mensuração de anticorpos contra o IBV nas superfícies mucosas, incluindo secreções lacrimais e traqueobrônquicas, e os dados obtidos não permitem um consenso sobre a relevância ou não desses anticorpos locais nos mecanismos de proteção contra o IBV.

Em relação à prevenção contra a infecção por IBV, a mesma se baseia principalmente na imunização das aves com vacinas vivas atenuadas, administradas pela via mucosa, como a intraocular, intranasal ou aerossol. E, nesse sentido, estudos dos mecanismos efetivos de imunidade protetora contra o IBV indicaram que tanto anticorpos locais dos isotipos IgA e IgY, como as células T citotóxicas locais CD8+ exercem atividades relevantes ou no bloqueio da atividade infecciosa ou na eliminação viral, tendo sido demonstrado que essas últimas células atuam de forma mais importante durante a fase inicial da infecção por esse vírus, ao passo que os anticorpos locais são essenciais nos mecanismos de imunidade nas fases subsequentes da infecção (CAVANAGH, 2007; KUMAR et al., 2009).

3.4 Morte Celular Programada nas Infecções Virais

A morte celular pode ser programada ou acidental. A morte celular programada resulta em morfologia lítica ou não lítica dependendo das vias de sinalização (JORGENSEN et al., 2017). A apoptose é uma forma ou tipo característico de morte celular programada, com importante papel durante o desenvolvimento e a homeostase celular, bem como em uma variedade de doenças, como as infecções virais. Por caracterização, a apoptose é uma forma de morte celular não lítica, típica e imunologicamente silenciosa, ou seja, é um dos principais mecanismos que as células eucarióticas usam para combater infecções virais. Ao induzir a morte celular, as células infectadas e os vírus contidos dentro das mesmas são eliminados (DE WITT, 2000; JORGENSEN et al., 2017).

A infecção viral se constitui num estímulo externo indutor da morte de células portadoras de patógenos virais, pois é um dos fatores que ativa o mecanismo de apoptose celular, também conhecido, como um processo fisiológico de morte celular programada (POONIA et al., 2009). A eliminação das células imunes do hospedeiro pela morte celular programada pode induzir à conclusão de que beneficiam patógeno infectante. No entanto, a morte celular programada é cada vez mais compreendida como um mecanismo que traz benefícios para o hospedeiro, por exemplo, eliminando o nicho intracelular de certos patógenos (JORGENSEN et al., 2017).

Apoptose celular é um evento altamente regulado, preciso e típico de morte celular programada, que ocorre nos organismos multicelulares para o descarte de células indesejadas, como as infectadas por vírus (SCOTT, 2010). A apoptose acontece tanto em eventos fisiológicos como em eventos patológicos. Em condições fisiológicas, tem papel importante durante todo desenvolvimento embrionário, como a remodelação de órgãos durante a embriogênese, homeostase, regulação hormonal, involução de órgãos, reações inflamatórias, regeneração e hematopoiese. Infecções virais, eliminação de células após dano por agentes genotóxicos (radiação, drogas citotóxicas anticancerosas, toxinas ou radicais livres) e atrofia patológica de órgãos e tumores são exemplos de apoptose patológica (POONIA et al., 2009; SCOTT, 2010).

Aparentemente, as células apoptóticas podem estar muito bem e, de fato, não apresentam nenhum tipo de dano em um processo característico de apoptose. Ao sofrer apoptose, a célula apresenta inúmeras alterações morfológicas e bioquímicas

típicas. Em geral e de forma padronizada, esse processo envolve apenas uma única célula, sem afetar as células adjacentes. Inicialmente, a célula apoptótica perde as microvilosidades e as proteínas de adesão, com redução de volume, por encolhimento do citoplasma, e da motilidade citoplasmática. A assimetria da membrana plasmática é descaracterizada, de modo que a fosfatidilserina, um lipídeo normalmente localizado na face interna da membrana, passa a localizar-se também na face externa. No núcleo, ocorre hipercondensação da cromatina, que se colapsa contra o envelope nuclear, o que culmina com a desintegração do núcleo e a formação de fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Diz-se que o núcleo está picnótico ou em picnose. Finalmente, a célula se desmembra em corpos apoptóticos, que são vesículas contendo os restos de citoplasma e organelas da célula que entrou em apoptose (POLLARD et al, 2006; SCOTT, 2010)

Ao longo de todo o processo, a membrana plasmática não é rompida, mas envolve os corpos apoptóticos, conhecidos também como apoptossomas, de modo que o conteúdo da célula morta não extravasa para o meio extracelular e não desencadeia uma resposta inflamatória. Esses corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados e eliminados por macrófagos migratórios e, como resultado, a célula desaparece sem nenhum fenômeno inflamatório decorrente, pois os corpos apoptóticos apresentam a fosfatidilserina exposta externamente à membrana, que inibem a ativação de macrófagos residentes que os fagocitam, evitando assim o desencadeamento de uma resposta inflamatória (POLLARD et al, 2006; LIAO et al., 2010; KRZYZOWSKA et al., 2011).

Os cadáveres celulares ou corpos apoptóticos resultantes da morte celular programada coordenam uma resposta imune inata apropriada para promover a resolução de uma infecção viral. No entanto, uma vez que a compreensão das defesas imunes inatas se baseia, principalmente, no trabalho dos agentes patogênicos para evadirem dessas defesas, muitas vezes é difícil reconhecer como as funções de morte celular são programadas em resposta às infecções. De fato, muitas descobertas de funções de morte celular baseiam-se em experimentos com agentes patogênicos que foram geneticamente modificados para remover suas estratégias normais de evasão do hospedeiro (JORGENSEN et al., 2017).

As vias de sinalização que desencadeiam o processo apoptótico são complexas. A apoptose pode ser desencadeada de duas maneiras: pelas vias intrínseca e extrínseca. A ativação da via extrínseca depende de uma variedade de fatores externos, como citocinas, toxinas ou ligação ao receptor de morte na superfície celular. A via de apoptose intrínseca é desencadeada pelo estresse celular, como proteínas virais, dano do DNA, ou estresse oxidativo, levando à ativação de moléculas na membrana mitocondrial. O processo apoptótico é estritamente regulado e controlado pelas células e pelo ambiente externo. As enzimas responsáveis pela ativação das vias de apoptose são denominadas caspases que, no interior das células, normalmente, estão inativas, de modo que nenhum componente externo, ou mesmo interno na célula, vai ativar as caspases desencadeando a apoptose (DE WITT, 2000).

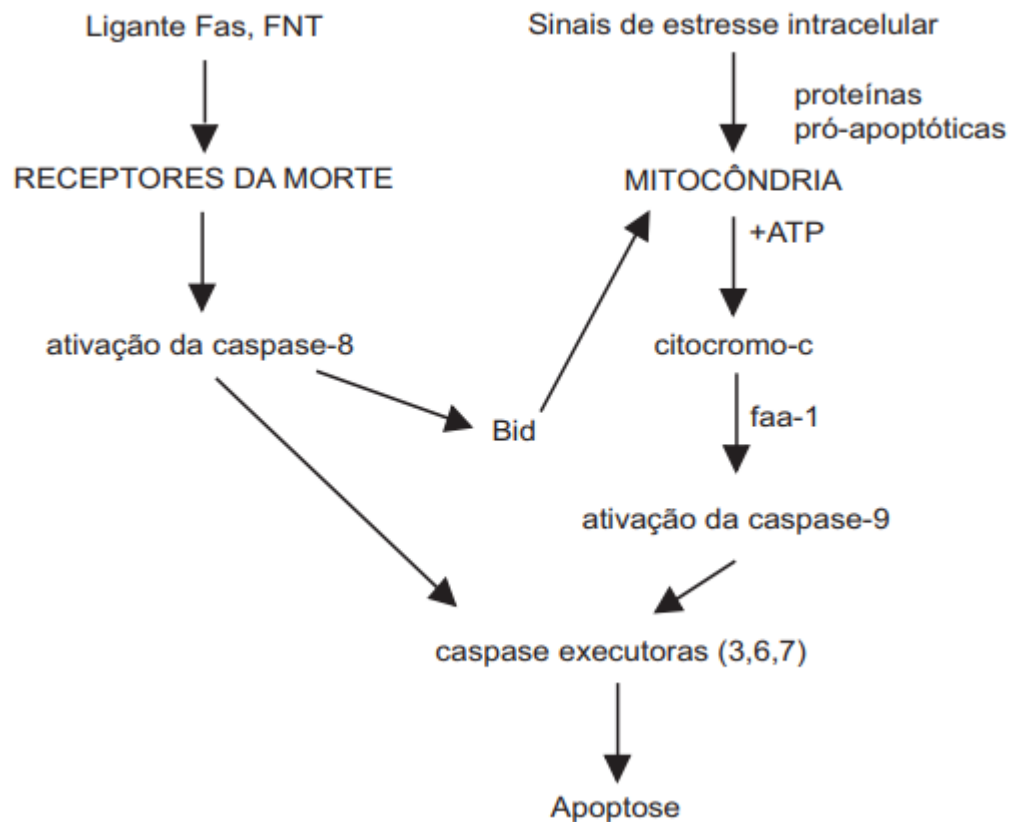
Após a ativação das caspases, ocorre uma série de alterações celulares. Inicialmente, a célula se desprende da matriz extracelular e inicia um processo de encolhimento, visto que as caspases degradam o citoesqueleto. Dessa forma, com a perda do esqueleto celular, inicia-se a retração celular, ocorrendo perda de volume, condensação do citoplasma e a compactação de organelas. Em sequência, ocorre a ativação de diversas enzimas DNases, responsáveis por degradar o ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*) nuclear em fragmentos característicos de 180 pares de bases, denominados de nucleossomos, típicos do processo apoptótico. Essa é uma das maneiras de diferenciar a apoptose de outros tipos de morte celular como, por exemplo, a necrose (PAROLIN; REASON, 2001).

Outra característica celular interna é a condensação da cromatina. Posteriormente, a cromatina se organiza, periféricamente, na membrana celular e o núcleo começa a se fragmentar em corpos apoptóticos, que são rapidamente reconhecidos e fagocitados por macrófagos. Para entender esse reconhecimento, faz-se necessário entender a organização da membrana em bicamada lipídica. As células normais ou saudáveis têm em sua membrana um tipo especial de fosfolípido, a fosfatidilserina, que fica organizada no folheto interno da membrana lipídica. Quando a célula entra em apoptose, a fosfatidilserina sofre translocação para o folheto externo da membrana celular e fica exposta ao meio externo, então, os macrófagos a reconhecem como um sinal para fagocitar os corpos apoptóticos, sendo esse, o principal mecanismo

de reconhecimento dos nucleossomos pelos macrófagos (LIAO et al., 2010; KRZYZOWSKA et al., 2011).

Assim, na morte celular por apoptose, não há extravasamento do conteúdo celular para o meio extracelular e, por isso, não há processo inflamatório, diferentemente, do que ocorre em outros tipos de morte celular. A ativação de caspases é o evento fundamental para que ocorra a apoptose. No meio intracelular, há um equilíbrio fino entre proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas, onde a perda desse equilíbrio determina o destino da célula, ou seja, se vai entrar em apoptose ou não. Duas vias distintas convergem para ativação de caspases, como a via mitocondrial (via intrínseca) e a via do receptor de morte (via extrínseca) (KAPLOWITZ, 2000; ROBBINS; COTRAN, 2006), conforme ilustra a Figura 5.

Figura 5 – Indução da apoptose pelas vias do Receptor de Morte e Mitocondrial.



FNT = fator de necrose tumoral; faa-1 = fator ativador da apoptose 1. Fonte: Kaplowitz (2000).

A via mitocondrial, mais especificamente, é a responsável pela maior parte das apoptoses. Os mecanismos capazes de ativar essa via envolvem a privação de sinais de sobrevivência, lesões no genoma nuclear e números inaceitáveis de proteínas mal dobradas no interior da célula. Dentro das mitocôndrias, há enzimas pró-apoptóticas, que são responsáveis por inibir as proteínas inibidoras de apoptose, presentes no citoplasma, e a citocromo C, responsável por ativar a caspase 9. Desse modo, o que determina se a célula vai entrar em apoptose ou não é a permeabilidade da membrana da mitocôndria, já que, uma vez alterada, as proteínas extravasam para o citoplasma e a célula entra em apoptose (POONIA et al., 2009; LIAO et al., 2010; XU, 2012).

A regulação da permeabilidade da mitocôndria é determinada por cerca de vinte tipos de proteínas da família BCL2, que são pró-apoptóticas, como por exemplo, a BAX e a BAK. Em situações de injúrias, essas proteínas alteram a permeabilidade da membrana, abrindo canais na membrana mitocondrial. Ocorre, então, o extravasamento de enzimas como a citocromo C e outras enzimas pró-apoptóticas para o citoplasma que culmina na ativação da caspase 9, que ativa as caspases efetoras, fazendo que a célula entre em apoptose (KRZYZOWSKA et al., 2006; KRZYZOWSKA et al., 2011).

Na via do receptor de morte, muitas células exibem, na sua superfície, moléculas receptoras chamadas de receptores de morte, que são da família do Fator de Necrose Tumoral (FNT) (CHANG et al., 2007). Existem dois tipos de receptores de morte, o receptor tipo 1 de FNT (FNT-R1) e a molécula CD95, também conhecida como FAS. Quando esses receptores de morte se ligam aos seus ligantes, como por exemplo, o FAS ao FAS-ligante, eles desencadeiam uma cascata de ativação intracelular de morte celular programada. Os receptores de morte possuem um domínio intracelular que se acopla a uma proteína adaptadora FAAD, que por sua vez se acopla à pró-caspase 8, provocando a sua ativação em caspase 8, que causa a ativação de caspases efetoras, que desencadeiam o mecanismo de apoptose (KRZYZOWSKA et al., 2006; KRZYZOWSKA et al., 2011). Em síntese, a via mitocondrial ativa a caspase 9, enquanto a via do receptor de morte ativa a caspase 8 e 10. Essas são caspases desencadeadoras, que ativam as caspases efetoras 3, 6 e 7, que participam o processo de apoptose em ambas as vias (CHANG et al., 2007).

Outra via de morte celular que atua na defesa imune inata contra infecções virais é a necroptose. Trata-se de uma forma de morte programada de células líticas, que pode ser desencadeada por uma variedade de caminhos intrincados, onde, a via mais simples, talvez seja pela proteína 1 (ZBP1), que se liga ao Z-DNA. A ZBP1 se liga tanto à Z-DNA quanto ao Z-RNA por domínios de ligação de dois DNA de Z, dessa forma, podendo responder à um vírus de DNA ou um vírus de RNA. Uma vez ativados, os domínios de ligação homotípica da proteína RIP, que interage com o receptor (RHIM), se liga a RHIM da RIP quinase 3 (RIPK3). Esta interação estimula a atividade de quinase RIPK3, ou seja, a sua autofosforilação e oligomerização, e dessa forma, a RIPK3 fosforila a quinase efetora de necroptose. Após a fosforilação da RIPK3, a pseudoquinase MLKL sofre uma interrupção conformacional e interage com o folheto interno da membrana plasmática, onde se oligomeriza para formar os poros necroptóticos. Etapas adicionais também podem regular a MLKL. Após a formação dos poros, a pressão osmótica do influxo de íons e água resulta em ruptura da membrana plasmática (KRZYZOWSKA et al., 2011; JORGENSEN et al., 2017).

Em suma, as diversas interações, que envolvem diferentes caminhos de morte celular programada, criam redes de sinalização complexas que se interagem mutuamente na defesa do hospedeiro contra os patógenos. As múltiplas vias de morte celular programada, apoptose e necroptose, se cruzam no triângulo de caspase 8-RIPK1-RIPK3 para a defesa imune inata. Parece provável que a intrincada fiação cruzada dessas vias desempenhe um papel importante na prevenção de patógenos virais, inibindo a função de receptores do tipo Toll, como o TLR3, TLR4 e o TNF-R1 (KRZYZOWSKA et al., 2006; JORGENSEN et al., 2017).

3.5 Citometria de Fluxo: Noções Básicas

Os ensaios mais clássicos utilizados para avaliação de apoptose em células infectadas por vírus incluem a detecção das mudanças morfológicas celulares por citometria de fluxo (NAKAGE et al., 2005). Esse ensaio é um recurso emergente na medicina veterinária que permite uma análise rápida, objetiva e quantitativa de células em suspensão. A citometria de fluxo é uma técnica relativamente recente, que serve

para separar, contar, examinar e classificar partículas microscópicas (FALDYNA et al., 2001). Como principal vantagem, ela permite estudar várias características de uma célula por vários parâmetros, por isso, é chamada de multiparamétrica, pois permite a análise individual de milhares de células em um curto espaço de tempo, o que a torna uma técnica consistente e bastante confiável para detecção de parâmetros morfológicos, bioquímicos e fisiológicos de células individuais (BROWN et al., 2015).

O desenvolvimento de novas tecnologias, como a citometria de fluxo, permitiu não apenas identificar e caracterizar as propriedades físico-químicas de células individuais como, também, avaliar eventos celulares como, por exemplo, apoptose e estresse oxidativo mitocondrial (TELFORD, 2015; DU et al., 2015). A necessidade cada vez maior de se obter informações sobre os processos biológicos tem conduzido ao desenvolvimento de equipamentos e técnicas cada vez mais modernas, que são empregados em diversas áreas de interesse da biologia. Assim, por ser empregada em estudos de células em fluxo e por possuir amplas aplicações, a citometria de fluxo, também, pode ser denominada como citometria de fluxo multiparamétrica (TEVA et al., 2009).

A citometria de fluxo é uma técnica quantitativa de análise celular e, atualmente, é o modelo tecnológico mais indicado e aplicado para estudar as várias características de uma célula (BROWN et al., 2015). A técnica começou a ser desenvolvida em 1934 por Andrew Moldaven, que elaborou um sistema em que células coradas, dentro de um tubo capilar sob a luz do microscópio óptico, passavam por um detector fotoelétrico e se submetiam a contagem e análise do tamanho celular conforme a incidência da luz. Desde então, a citometria de fluxo vem sendo aperfeiçoada e inúmeras versões aprimoradas, cuja versão mais moderna, chamada de separador celular ativado por fluorescência (FACS, do inglês *Fluorescence Activated Cell Sorter*), é resultante do aprimoramento tecnológico, o qual se utiliza da automação das análises e faz a diferenciação celular pelo emprego prévio de anticorpos fluorescentes (LORENZI, 2003). Comercialmente, os citômetros de fluxo foram introduzidos no final dos anos 70 e alguns aparelhos são capazes de separar fisicamente as células, de acordo com as características citométricas (O'DONNELL et al., 2013; BROWN et al., 2015).

A citometria de fluxo mensura parâmetros em células em suspensão, que fluem através de um sistema de análise. A técnica de citometria de fluxo é realizada por um aparelho composto por três principais sistemas de operação: o sistema de corrente líquida, responsável por transportar as células individuais em fluxo laminar até o ponto de interceptação pelo *laser*; o sistema óptico, formado por um feixe de *lasers* incidente monocromático e filtros que direcionam os sinais luminosos para sensores apropriados de mensuração; e o sistema eletrônico que, proporcionalmente, converte os sinais luminosos em sinais eletrônicos, designados pulsos de voltagem, que são armazenados e, posteriormente, processados pelo computador (BECTON, 2000).

O princípio básico de funcionamento da citometria de fluxo utiliza feixe de laser e um identificador de luz para a contagem individual das células íntegras que se encontram em suspensão. As células da amostra em suspensão são marcadas com anticorpos monoclonais específicos ligados a fluorocromos, que permitem a identificação e a quantificação de células pelo tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência (ROITT et al., 1999). As medições das propriedades físicas e/ou químicas da célula ocorrem por captação que emprega um sistema óptico e eletrônico, que aponta o modo como a célula ou partícula faz a dispersão da luz do laser refletido, irradiando a fluorescência. Assim, as propriedades celulares mais analisadas dentro do sistema de separador celular ativado por fluorescência compreendem o complexo mecanismo interno das micropartículas, o tamanho, granulosidade e a intensidade da fluorescência (TEVA et al., 2009).

As células em suspensão da amostra são marcadas com reagentes fluorescentes específicos (anticorpos monoclonais) para detecção de moléculas de superfície e, em seguida, são introduzidas em uma câmara de fluxo vibratória. A suspensão celular é injetada no centro da câmara de fluxo, que se encontra preenchida por uma solução salina, chamada de fluxo de revestimento, que apresenta pressão inferior à pressão da suspensão celular. Por focalização hidrodinâmica, as células são forçadas a passar individualmente, em fluxo laminar, pelo centro da câmara de fluxo, onde são interceptadas por um laser, que incide perpendicularmente sobre elas. A diferença de pressão entre os dois fluidos faz com o que o fluxo seja laminar. A pressão da amostra é superior à pressão da solução tampão de revestimento e ajustável, assim,

é possível aumentar ou diminuir o fluxo da amostra ao alterar a pressão da amostra e fazer com mais células sejam interceptadas pelo *laser* no mesmo período, resultando em informações que serão analisadas (ROITT et al., 1999; BECTON, 2000)

A solução tampão, que envolve o fluxo de células, atravessa a câmara levando cerca de 500 a 4000 células ou partículas, que passam em fila simples por segundo por meio do sensor eletrônico. O fluxo é iluminado por *laser* de argônio (coloração azul), que tem uma energia de luz incidente de 488 nanômetros. Cada célula é avaliada com relação ao tamanho e granulosidade e para intensidade de fluorescência para detecção de antígenos de superfície diferentes. A vibração do fluxo celular provoca o rompimento em gotículas que podem ser carregadas eletricamente e, a partir daí, são dirigidas por placas de deflexão eletromagnética para serem coletadas em diferentes populações celulares de acordo com os parâmetros medidos, sob controle de um computador (ROITT et al., 1999).

Os parâmetros medidos podem ser detectados em canais ópticos ou em canais de fluorescência. Os canais ópticos determinam características morfológicas das células, como tamanho e complexidade interna, utilizando a dispersão da luz observada durante a interação física do *laser* com a célula. Ao interceptar a célula, o feixe de luz é desviado em todas as direções e a luz desviada, frontal e lateralmente, fornece informações morfológicas importantes sobre a célula, e a luz difratada, é então, coletada por lentes e direcionada para um detector de fotodiodo, que capta a intensidade da luz e dispersa frontalmente, fornecendo informações sobre o tamanho da célula (RILEY, 2005). A luz refratada e refletida é coletada por lentes localizadas perpendicularmente à fonte luminosa e transmite o sinal para um tipo de detector muito sensível, chamado de tubos fotomultiplicadores (CÔRTE-REAL et al., 2002) que captam a intensidade da luz dispersa lateralmente, em um ângulo de 90°, fornecendo informações sobre a complexidade e granulosidade interna da célula. É necessário utilizar um detector muito sensível para a dispersão lateral, porque essa dispersão corresponde a cerca de 10% do sinal de luz emitida. A intensidade da luz dispersa frontal e lateralmente é proporcional ao tamanho e complexidade interna das células, o que permite a identificação de diferentes tipos celulares em uma população heterogênea (PERES; CURI, 2005).

Além dos parâmetros morfológicos, o *laser* também é capaz de excitar fluorocromos ou compostos celulares com fluorescência intrínseca. Os fluorocromos, uma vez excitados pelo *laser*, absorvem energia e reemitem-na como fluorescência pela emissão de fótons com maior comprimento de onda e menor energia (GREEN; WACHSMANN-HOGIU, 2015). Essa fluorescência, assim como a dispersão lateral da luz, é detectada por tubos fotomultiplicadores, sendo que a intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de marcadores presentes na célula. Então, a fluorescência é direcionada para os tubos fotomultiplicadores por filtros ópticos altamente específicos, que captam e convertem os sinais luminosos em pulsos elétricos, que serão amplificados, digitalizados, armazenados em computador e, posteriormente, serão analisados por programas específicos (MURMANN, 2007; TEVA et al., 2009).

O sistema óptico desempenha as principais funções, excitação e detecção. Os componentes de excitação são *lasers*, prismas e lentes, enquanto que os componentes de detecção são lentes, cabos de fibra óptica, espelhos, filtros e detectores. Quando o *laser* intercepta a célula, a luz dispersa e emitida é coletada por lentes apropriadas que conduzem, por meio de cabos de fibra óptica, a fluorescência emitida até filtros e detectores específicos. Os sinais luminosos gerados pelo *laser* azul são captados por octógono de detectores em série, enquanto que os sinais gerados pelo *laser* vermelho são captados por um triângulo. Filtros estão localizados em frente a cada um dos detectores para refletir e transmitir comprimentos de onda específicos (PERES; CURI, 2005). Dessa forma, a citometria de fluxo é uma poderosa e bem estabelecida ferramenta pela utilização de *laser* óptico, que possibilita realizar a separação, a contagem, o exame e a classificação individual de células, ou seja, a medida simultânea de múltiplas características físicas, químicas e biológicas de células ou partículas suspensas em meio líquido, orientadas em um fluxo laminar e interceptadas uma a uma por um feixe de luz incidente (RILEY, 2005; TEVA et al., 2009).

Apesar do alto custo e da necessidade de técnicos especializados para realização da avaliação citofluorométrica, no Brasil, essa técnica tem sido aplicada em diversos projetos científicos relacionados à medicina veterinária. A citometria de fluxo tem uma ampla aplicação na hematologia veterinária, incluindo a identificação de células-tronco hematopoiéticas, contagens celulares diferenciais da medula óssea,

quantificação de reticulócitos, pesquisa de eritroparasitas, detecção de anticorpos anti-eritrocitários, contagem diferencial de leucócitos, imunofenotipagem de linfócitos e contagem de plaquetas reticuladas (NAKAGE et al., 2005).

3.6 *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* – ELISA

A quantificação de anticorpos é muito importante para monitoramento sorológico em granjas e pode ser associada à proteção contra o IBV (RAUW et al., 2009). No que concerne às ferramentas de imunodiagnóstico ou monitoramento de imunidade humoral disponíveis para a BIG, os ensaios imunoenzimáticos conseguem gerar indicadores bastante acurados dos níveis de anticorpos produzidos por aves infectadas ou imunizadas com o IBV, facilitando, dessa forma, a avaliação do estado imune em granjas onde está sendo criado um número muito grande de aves. A aplicação de métodos rápidos para o diagnóstico, juntamente com a utilização de técnicas para a determinação do estado imune após a administração de vacinas contra essa doença infecciosa, é de grande relevância para se conseguir um controle mais efetivo de surtos da infecção pelo vírus (CAVANAGH, 2007).

O ELISA, do inglês *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, é um método sorológico e de imunodiagnóstico, frequentemente, usado para monitorar a resposta imune adaptativa humoral das aves (RAUW, et al., 2009). A sorologia de aves é uma ferramenta amplamente utilizada para diagnóstico, identificação de infecções agudas no campo, monitoramento de anticorpos maternos, estabelecimento de curvas de tendências para doenças aviárias, adequação do programa de vacinação e avaliação do desempenho de vacinas. Em planteis avícolas, o uso da sorologia compõe as medidas de biossegurança adotadas, pois se destaca como um método de análise laboratorial fundamentado em auxiliar o sanitarista da granja a visualizar, de maneira rápida e objetiva, a situação sanitária do lote comercial (HOLT, et al., 2010).

No caso da BIG, a técnica de ELISA é aplicada para detecção de anticorpos contra o IBV em amostras de soro de aves comerciais. Por apresentar grande sensibilidade e especificidade, é considerada como um dos métodos imunológicos mais utilizados para quantificar a concentração de antígenos e anticorpos em planteis

avícolas. Dessa forma, o ensaio se constitui em um indicador de imunidade humoral, que permite uma análise da resposta pós-vacinal e de infecção em aves adultas vacinadas, sendo capaz de detectar imunoglobulinas IgM e IgY ainda na primeira semana após infecção ou vacinação (CAVANAGH; NAQI, 2003).

As medidas de controle da BIG são baseadas no teste de ELISA, que fornece um diagnóstico rápido da infecção pelo vírus e determinação da resposta imunológica em plantéis de aves de criações industriais (GIBERTONI; MONTASSIER, 2005). Os testes ELISA apresentam ainda inúmeras vantagens sobre outros testes de diagnóstico, se destacando como uma prova rápida, de fácil aplicação, além de permitir um melhor custo-benefício com otimização do tempo de processamento. Trata-se de um método eficiente, com alto limiar de detecção, pois permite detectar quantidades de proteína da ordem de nanogramas. Possui vantagem comparável aos ensaios radioimunizantes, que possuem ainda limitações relacionadas ao uso de radioatividade (VIDAL; RAZIA, 2006). Outras vantagens relacionadas ao teste são estabilidade e pequeno volume de reagentes, resultados de natureza quantitativa, baixo nível de perigo biológico, e ainda, permite a análise de amostras em larga escala, sendo também usada para estudo epidemiológico (ALMEIDA; LIMA, 2001).

O ensaio de ELISA pode ser realizado com *kits* comerciais padronizados e se baseia em reações enzimáticas. Nesse método, uma enzima é covalentemente ligada a um anticorpo específico que reconhece um antígeno alvo. A peroxidase é a enzima mais comumente utilizada, por catalisar a reação de desdobramento da água oxigenada em água e oxigênio. Caso ocorra o reconhecimento do antígeno pelo anticorpo, a enzima irá reagir com um substrato incolor que produzirá coloração. Desse modo, se o antígeno estiver presente, o complexo anticorpo-enzima irá ligar-se a ele e a enzima catalisará a reação. Assim, a presença de coloração indica a presença de antígeno (ALMEIDA; LIMA, 2001). A ligação do antígeno ao anticorpo ocorre geralmente em microplacas, onde são depositados os reagentes. Após a reação colorimétrica, a placa é lida em um leitor de microplacas (MURPHY, 2014).

Entre os diversos tipos de ELISA, destaca-se o ELISA indireto, que é um ensaio amplamente utilizado para a detecção e/ou quantificação de anticorpos em amostras de soro, com destaque em estudos soropidemiológicos. A especificidade dessa prova é

garantida principalmente pela qualidade do antígeno adsorvido à placa (MADRUGA et al., 2001). Nesse método, utilizam-se duas IgGs, uma para reconhecer o antígeno e outra (anti-IgG) produzida em diferentes espécies de animal que reconhece a primeira IgG, com a qual se ligará. O antígeno fica aderido aos poços da microplaca, e em seguida, é colocado ao soro um anticorpo marcado com uma enzima que reage com o substrato, fazendo com que o cromógeno mude de cor. A presença de cor nos poços indica a presença do anticorpo, enquanto que nos poços que não mudaram de cor, é indicada a ausência do anticorpo em questão ou de interesse (MURPHY, 2014).

Enfim, resultados obtidos pela técnica de ELISA indireto podem se constituir em uma importante ferramenta para aplicação em estudos soropidemiológicos e de eficiência vacinal, permitindo identificar áreas e respectivas populações expostas ao risco de infecção por agentes infecciosos, como o IBV (MONTASSIER, 2010).

CAPÍTULO 2

Mitochondrial bioenergy alterations in avian HD11 macrophages infected with Infectious Bronchitis Virus

Artigo publicado no periódico
Archives of Virology



Mitochondrial bioenergy alterations in avian HD11 macrophages infected with infectious bronchitis virus

Sergio E. L. da Silva¹ · Helena L. Ferreira² · Andrea F. Garcia⁴ · Felipe E. S. Silva³ · Roberto Gameiro³ · Carolina U. F. Fabri³ · Dielson S. Vieira³ · Tereza C. Cardoso³

Received: 28 August 2017 / Accepted: 22 November 2017
© Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2018

Abstract

To establish an association between mitochondrial dysfunction and apoptosis following infectious bronchitis virus (IBV) infection, HD11 avian macrophage cells were infected with the Massachusetts 41 (M41) strain. Our results show that the M41 strain of IBV induced cytopathic effects followed by the release of new viral particles. Elevated numbers of apoptotic cells were observed at 24, 48 and 72 h post-infection (p.i.). Viral infection was associated with mitochondrial membrane depolarization and reactive oxygen species (ROS) production at all of the examined timepoints p.i. In summary, IBV M41 replication in infected HD11 macrophages seems to induce mitochondrial bioenergy failure, acting as a respiratory chain uncoupler, without compromising viral replication.

Infectious bronchitis virus (IBV) is taxonomically classified within the order *Nidovirales*, subfamily *Coronavirinae* and genus *Gammacoronavirus* and is associated with respiratory disorders in poultry [2, 5, 8–10, 15]. Macrophages are members of the mononuclear phagocyte system and represent the first line of adaptive immune response by destroying invading pathogens [6, 13]. An important difference between mammalian and avian lungs is the lack of lymph nodes and resident macrophages in the avian respiratory tract, thus requiring an influx of phagocytic cells to initiate the defense against infectious agents [12, 21].

Apoptosis is one of the primary mechanisms that animals use to combat viral infections [11]. By inducing cell death, infected cells and viruses contained within the are eliminated [7, 14]. Apoptosis can be triggered in two ways:

intrinsic and extrinsic pathways [11]. Extrinsic pathway activation depends on a variety of external factors, such as cytokines, toxins, or ligands binding to death receptors on the cell surface. The intrinsic apoptosis pathway is triggered by cell stress, and is induced by viral proteins, DNA damage, or oxidative stress, leading to the activation of molecules on the mitochondrial membrane [16–18, 22, 23].

Mitochondria are implicated directly in several host and viral responses [20]. These organelles participate in major early anti-viral immune responses through changes in their metabolism [19]. Viral infection may interfere with mitochondria bioenergetics by affecting cellular respiratory function. Moreover, viral proteins inserted in mitochondrial membranes present anti- and/or pro- apoptotic effects, affecting cell survival/death pathways [22, 23, 25].

The aim of this study was to investigate whether IBV M41 strain-infected avian macrophages (HD11 cell line) show mitochondrial dysfunction at 24, 48 and 72 h post-infection. For this purpose, apoptosis, reactive oxygen species, and mitochondrial membrane depolarization were investigated in these infected cells.

Chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). All culture dishes and flasks were purchased from BD Falcon (BD Falcon, Bedford, MA, USA) unless otherwise specified. This study used the IBV M41 strain kindly supplied by the Veterinary College of FCAVJ,

Handling Editor: Sheela Ramamoorthy.

✉ Tereza C. Cardoso
tcardoso@fmva.unesp.br

¹ Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV), Universidade Federal Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brazil

² Department of Veterinary Medicine, FZEA-USP-University of Sao Paulo, Pirassununga, SP, Brazil

³ College of Veterinary Medicine, UNESP-University of São Paulo State, Araçatuba, SP, Brazil

⁴ Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium, UniSLESIANO, Araçatuba, SP, Brazil

UNESP, Jaboticabal, SP, Brazil. IBV M41 was propagated in allantoic fluid from chicken-specific, pathogen-free embryos according to rules established for animal care at the Veterinary College, FMVA, UNESP, Araçatuba, SP, Brazil (protocol number 2016/3456). Viral suspensions were titrated by serial 2-fold dilutions and expressed as embryo infectious dose 50% (EID₅₀) [6]. The HD11 cells, an avian macrophage cell line, were purchased from Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), Brazil. The susceptibility of HD11 cells to IBV M41 infection was verified by morphological changes (cytopathic effect), cell proliferation assays, virus recovery after CEK (chicken embryo kidney cell) infection and indirect immunofluorescence assays (IFA) at 24, 48 and 72 h p.i.

For IBV M41 infection, HD11 cells were initially cocultured with CEK cells, prepared according to a standard protocol as described previously [6], and maintained in Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM; Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), antibiotics (100 U penicillin and 100 mg streptomycin/ml), and 1.5 mM L-glutamine [11, 14]. IBV M41 strain infection was performed at a multiplicity of infection (MOI) of 1.0 in cell culture medium, and cells were incubated at 41 °C, 5% CO₂, and 95% humidity at a density of 1×10^5 cells/cm² for HD11 cells and 2×10^4 cells/cm² for CEK cells. After 6 h, HD11 cells were removed along with the culture supernatant, placed into 6-well plates, and cultured as unique macrophage cultures. Triplicate wells were used for virus or mock infections at 24, 48, and 72 h post-infection (p.i.). Infected and control HD11 cells were visualized under phase-contrast using an Olympus IX 70 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) and at least 10 fields were analyzed for each condition. Photographs were taken at 40 x magnification using cell Sens software (Olympus). The numbers of HD11 cells per slide (n = 5) were assessed using an AxioImager® A.1 light microscope connected to an AxioCam®MRc (Carl Zeiss®, Oberkochen, Germany). The images were processed using AxioVision® 4.8 software (Carl Zeiss®).

TCID₅₀ titrations were applied to infected and control (mock-infected cells supplemented with culture medium) HD11 cells to measure infective viral particle recovery, as described previously at all p.i. [14]. Cell proliferation analysis was performed using an *in vitro* Toxicology Assay Kit, an MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)-based assay, following the manufacturer's instructions. IBV M41 infected cells and control cells were prepared for virus immunostaining as described previously [4]. After being fixed with 4% paraformaldehyde, the cells were hydrated for 15 min followed by incubation overnight at 4 °C with the primary antibody, a monoclonal anti-IBV nucleoprotein antibody (no. nAB90926, Abcam, Cambridge, UK) diluted at 1:50. After three washes, antibody binding was visualized by incubating cells with protein A conjugated to FITC (fluorescein isothiocyanate; Sigma-Aldrich),

and nuclear staining was performed by incubating cells with 1 mg/ml of DAPI (4'-6-diamino-2-phenylindole; Sigma-Aldrich®) diluted in Fluormount aqueous medium. Images were collected using an AxioImager A.1 light and an ultraviolet (UV) microscope connected to an AxioCamMRc camera (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) and at least 10 fields from each slide (corresponding to p.i. periods) were analyzed. The results for IBV-reactive cells were expressed as percentage IFA positive cells at each time-point p.i.

To evaluate apoptosis and ROS production, the same HD11 culture conditions were used. Flow cytometric analysis of apoptosis/necroptosis and ROS production was performed using an Attune acoustic focusing cytometer system at 24, 48, and 72 h after IBV M41 infection (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Apoptosis/necroptosis was measured using a double staining method with the Vybrant Apoptosis Assay Kit (Molecular Probes, Life Technologies) and the APO-BrdU TUNEL Assay Kit (Molecular Probes, Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. The differentiation of early apoptotic, secondary necrotic, necroptotic, and viable cells was made according to their phenotype: BrdU +/PI- cells were considered early apoptotic, BrdU-/PI+ were considered necroptotic, BrdU+/PI+ were considered secondary necrotic, and BrdU-/PI- were considered viable cells. The results are expressed as Δ % of each cell phenotype. The ROS production was measured using a Fluorometric Intracellular ROS kit (MAK142, Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 1×10^6 cells/ml, were centrifuged and the resulting pellet was mixed in 40 µl of ROS detection reagent solution. In parallel, HD11 cells were treated with 1.5 µM of staurosporine (Sigma-Aldrich) for 6 h to induce apoptosis as a positive control. After treatment, IBV was inoculated into cell cultures and monitored at all indicated times p.i. The ROS positive control used was cells exposed to 5% CO₂ for 30 min.

To perform the mitochondrial membrane potential assay, 2×10^3 infected or mock infected cells were incubated with 10 µg/ml of JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetrathylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) for 10 min at 37 °C and analyzed by acoustic flow cytometry performed in the dark as described in a previous study [4]. The HD11 cells were also fixed in 4% of paraformaldehyde and documented to visualize JC-1 probe staining. Cell mitochondria were isolated by a modified procedure based on a previously described method [24]. Next, 500 µl each from a HD11 cell suspension of IBV M41 infected or mock infected cells at each indicated time p.i. were placed into 1 ml of isolation buffer containing 0.21 M mannitol, 70 mM sucrose, 1 mM EGTA, 1 mg/ml BSA, and 5 mM HEPES-KOH, pH 7.4 and homogenized gently three times for 15 s at 1-min intervals. The homogenate was then centrifuged at 3,000 x g for 2 min.

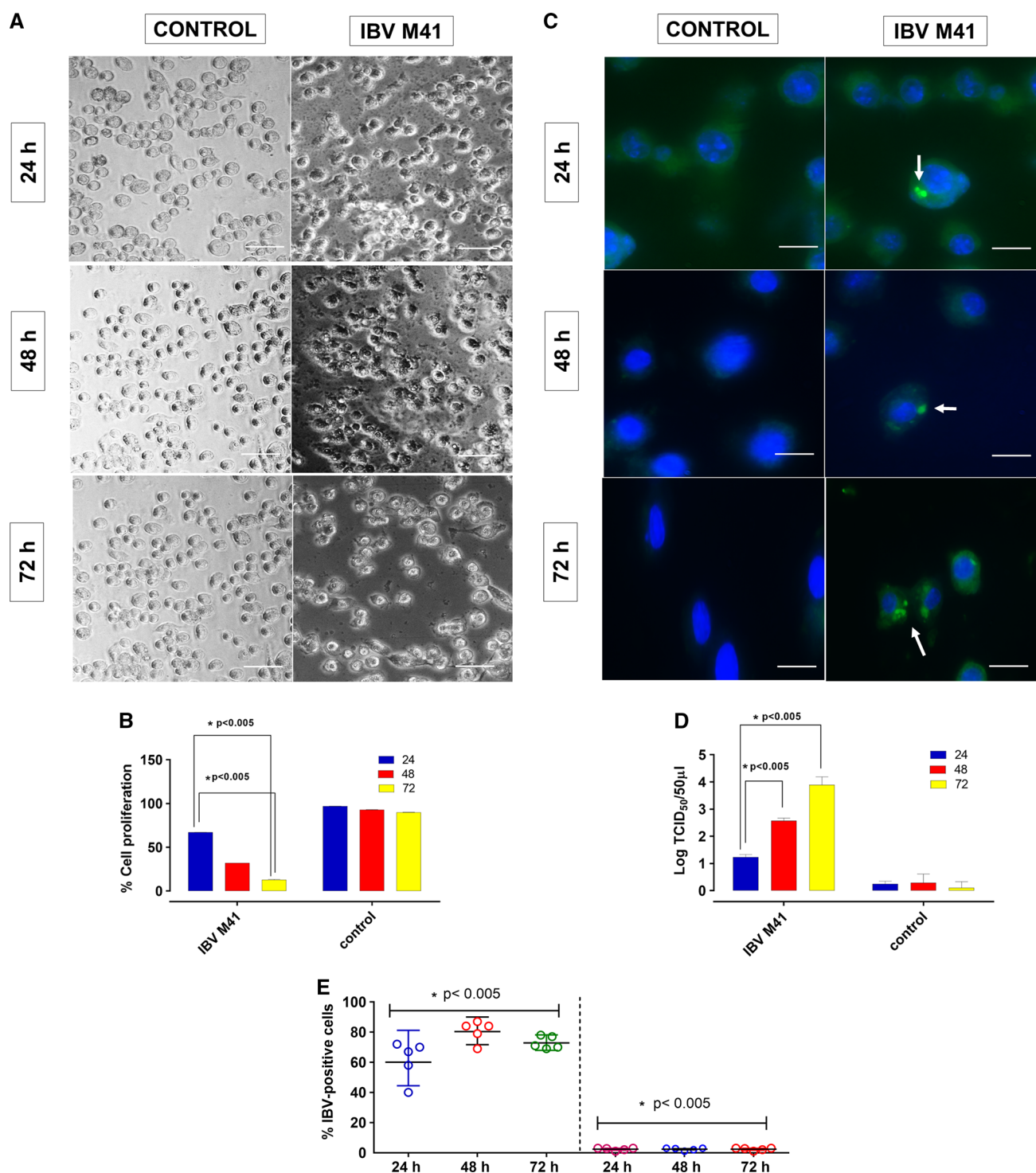


Fig. 1 A) Cytopathic effects in IBV M41 HD11 infected cells at 24, 48, and 72 h p.i. assessed by phase-contrast microscopy. Uninfected HD11 cells were used as controls. IBV M41 cytopathic effects were characterized as lysis and rounding or darkening of cells. Microphotographs are representative of three replicates of each experiment (bars 40-µm). B) Cell proliferation, examined using an MTT assay, indicates progressive decreases, in comparison to uninfected cells (control). C) Analysis of IBV M41 antigen detection (green-arrows) in HD11 cells followed by DAPI counterstaining (blue) by immuno-

cytochemistry at all indicated times p.i. Uninfected HD11 cells (control; bars 40-µm). Microphotographs are representative of three replicates of each experiment. D) IBV M41 titers were calculated to be higher at 72 h p.i. (* $p < 0.005$) and are expressed as CEK TCID₅₀. Nascent virus particles were recovered from infected HD11 cells. These data were obtained from three different experiments. E) Frequency of detection of IBV antigen by IFA at 24, 48 and 72 h p.i. The mean value was statistically significant (* $p < 0.005$) (color figure online)

The resulting supernatant was subsequently centrifuged at 12,000 x g for 20 min. The resulting pellet was suspended in 500 µl of isolation buffer with 0.02% digitonin added and was centrifuged again at 12,000 x g for 10 min. This pellet was then suspended in 1 ml of second buffer containing 0.21 M mannitol, 70 mM sucrose and 5 mM HEPES-KOH, pH 7.4, and centrifuged at 12,000 x g for 10 min. The final pellet was suspended in 250 µl of the second buffer and was used for the respiratory assay. Mitochondria respiration was monitored using a Clark-type oxygen electrode (Strathkelvin Instruments Ltd, Glasgow, Scotland, UK). A total of 1 µg of mitochondrial protein was added to 100 µl of respiration buffer containing 100 mM KCl, 75 mM mannitol, 25 mM sucrose, 5 mM Na₂HPO₄, 0.05 mM EGTA, and 10 mM TRIS-HCl, pH 7.4 at 30 °C. Oxygen consumption was measured using 5 mM succinate (+ 5 nM rotenone) as a respiratory substrate in the absence (state-4 respiration) or presence (state-3 respiration) of 400 nmol ADP. CCCP (m-chlorophenylhydrazine) was used at 1 µM as an uncoupler and positive control.

Statistical analysis was performed using GraphPad Instat 6.00 for Windows (GraphPad Software, LaJolla, CA, USA). Three replicates for each experiment were performed, and the results are reported as the mean ± s.d. One-way ANOVA was used for multiple comparisons. Values of $p < 0.05$ were considered to be significant.

The first experiment was conducted to both characterize the replication of the IBV M41 strain in the HD11 cell line and the induced cytopathic effects and release of nascent virus. In this study, a co-culture system of CEK and HD11 cells 6 h after IBV M41 infection was performed to enhance virus replication. The IBV M41 infection was visualized and showed cell lysis and fusiform, ‘dark cell’ shapes (Fig. 1A). Cell proliferation during IBV M41 replication was evaluated by MTT assay and a progressive loss of cell viability could be detected (Fig. 1B). IBV antigen was detected by immunocytochemistry, as indicated by a representative photomicrograph of HD11 cells infected by the IBV M41 strain at 24, 48, and 72 h p.i. (Fig. 1C). Thus, a peak viral titer at 72 h p.i., obtained in CEK cells, demonstrated infective IBV particles had been recovered from infected HD11 cells (Fig. 1D). IBV antigens were detected in between 70 and 80% of infected

HD11 cells at all time-points p.i. (Fig. 1E). A significant correlation was detected ($r = 0.978$) between virus titer and immunostaining ($p < 0.005$). Interaction of avian viruses and macrophages in culture can be visualized by examining virus-induced cytopathic effects, the presence of viral antigens, and the recovery of new viral particles [21]. While differences in the susceptibility of macrophages to viruses are clearly shown to be dependent upon the source of the macrophages in question, not all avian viruses are able to propagate in macrophage cultures [1, 3, 13, 14]. For example, the HD11 macrophage cell lineage has been shown to be resistant to Marek’s disease virus (MDV) and some IBV strains [21]; however, MDV can replicate in macrophages obtained directly from avian organs [3] and Beaudette IBV strain can replicate in HD11 cells [14] whilst IBV M41 can infect the MQ-NCSU culture, as shown recently [1].

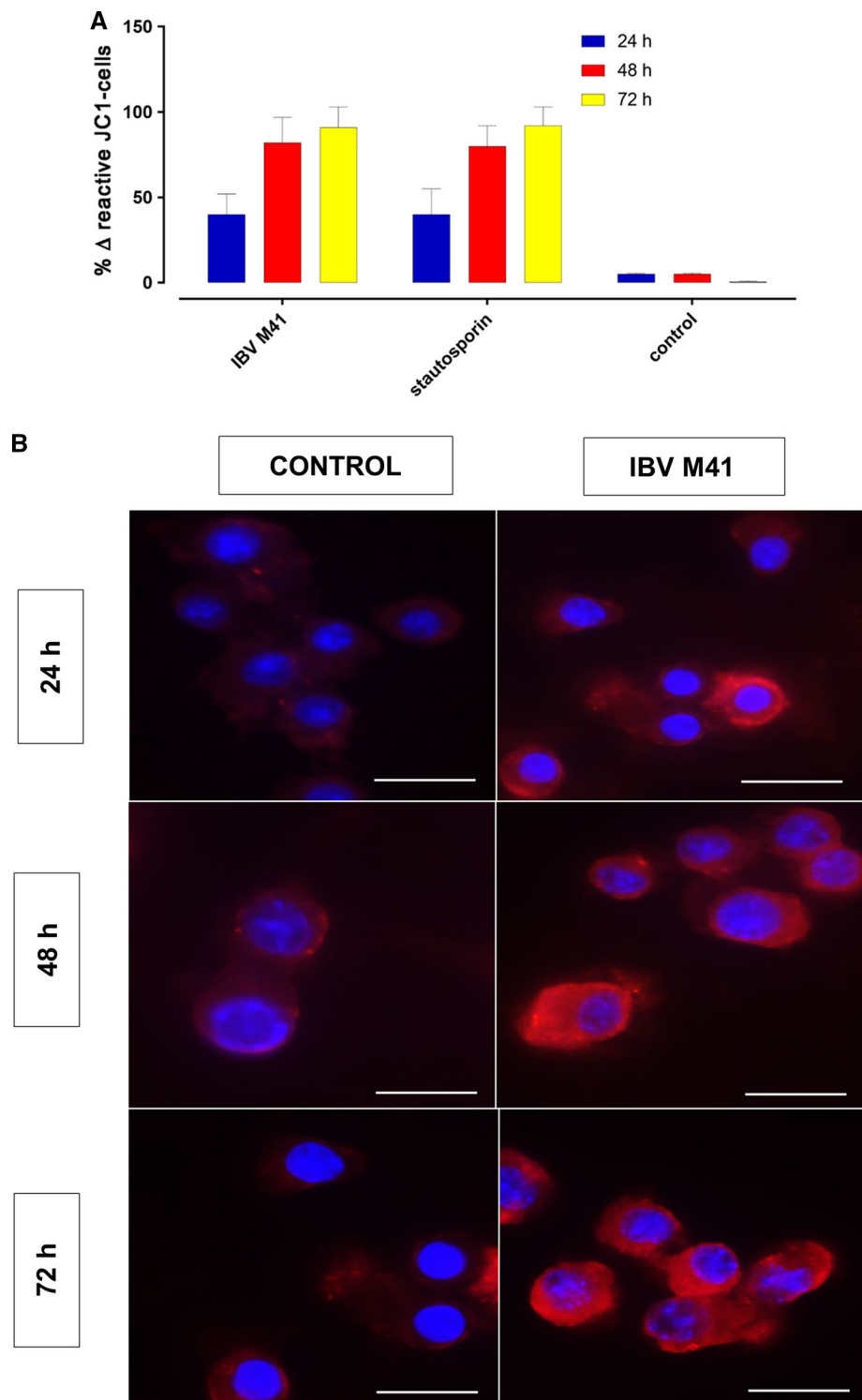
To investigate whether apoptosis was occurring during IBV-induced macrophage death, the TUNEL assay was applied at 24, 48, and 72 h p.i. Analysis of IBV-infected HD11 cells revealed early apoptosis which reached the same levels, approximately 65% to 70%, at all timepoints p.i. (Table 1). Similarly, no differences in early apoptosis/necroptosis rates were observed (Table 1). In summary, these results show that IBV M41 strain replication directly affects HD11 viability during an early apoptotic phase. The mitochondrial (intrinsic) pathway is finely regulated, upstream of the organelles themselves, by the concerted action of many molecules, including a family of Bcl-2 proteins, which consists of both pro-apoptotic (BH3-only proteins and multidomain proteins) and anti-apoptotic (Bcl-2-like proteins) members [21]. Several reports describe apoptotic *in vitro* mechanisms related to IBV infection, including both extrinsic and intrinsic pathways [6, 12, 14, 16–18].

IBV M41 infection leads to mitochondria membrane depolarization and ROS production in HD11 cells (Fig. 2 and 3). Moreover, JC-1 probe emission and staining was analyzed (Fig. 2A and B), revealing that the IBV M41 strain produced mitochondrial membrane depolarization at 48 h p.i., which increased at 72 h p.i. (Fig. 2A and B). This finding was confirmed by photomicrographic analysis of JC-1 complexes inside HD11-infected cell cytoplasm (Fig. 2B). Replication of the IBV M41 strain in HD11 cells was able

Table 1 Proportion of BrdU/PI labeled HD11 cells after 24, 48 and 72 h of IBV M41 strain infection

	Dead (% ± sd) (BrdU-/PI+)	Secondary necrotic (% ± sd) (BrdU+/PI+)	Early apoptotic (% ± sd) (BrdU+/PI-)	Viable (% ± sd) (BrdU-/PI-)
24 h	12.7 ± 3.8	9 ± 1.0	67.6 ± 6.0	10.7 ± 1.3
48 h	10 ± 1.5	11.3 ± 2.9	65.8 ± 4.7	12.9 ± 3.6
72 h	16.8 ± 4.9	9 ± 0.9	70.4 ± 3.9	3.8 ± 7.9
Control	5.6 ± 1.2	0.5 ± 0.1	5.0 ± 0.6	88.9 ± 7.8
Staurosporine	70 ± 9.7	16 ± 2.3	10.7 ± 2.7	3.3 ± 1.7

Fig. 2 A) Acoustic focusing cytometer analysis performed to measure JC-1 emission at all indicated times p.i. illustrated as % Δ of reactive cells in a bar graph. The data were obtained from three different experiments and processed using an Attune acoustic focusing cytometer with auto-fluorescence being excluded using a global compensation tool. B) JC-1 staining revealed red deposits in HD11 infected cells (bars 40- μ m)



to activate the oxidative stress pathway to varying degrees (Fig. 3A). Mitochondrial oxygen consumption was monitored during IBV M41 infection and in mock infected cells (control). The parameters assessed were state-3 respiration (consumption of oxygen in the presence of respiratory substrate and ADP) and state-4 respiration (consumption

of oxygen after ADP has been exhausted). After IBV M41 infection HD11 cells failed to undergo both state-3 and -4 respiration, when compared to mock infected cells (Fig. 3C). These results indicate that the IBV M41 strain acts as an uncoupler in the respiratory chain. One class of uncoupler is the protonophores, such as CCCP, which are weak acids

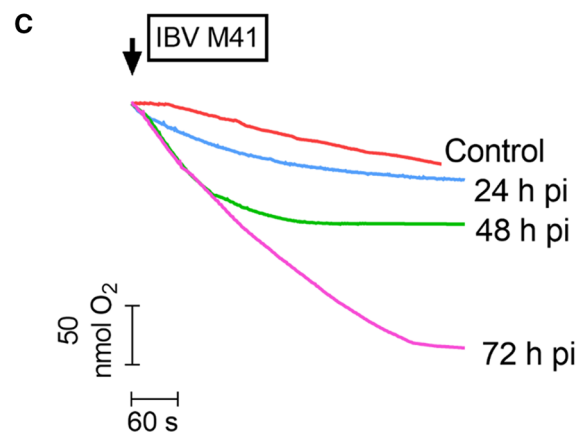
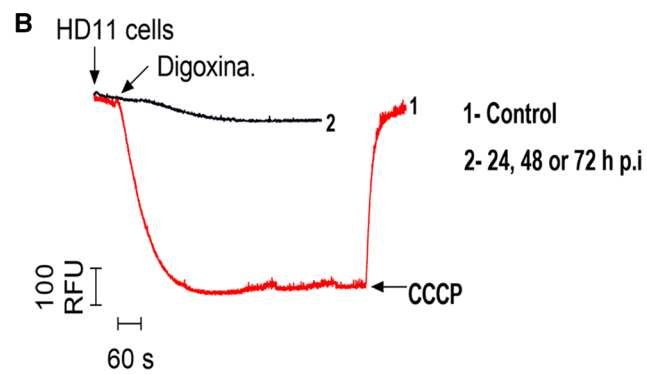
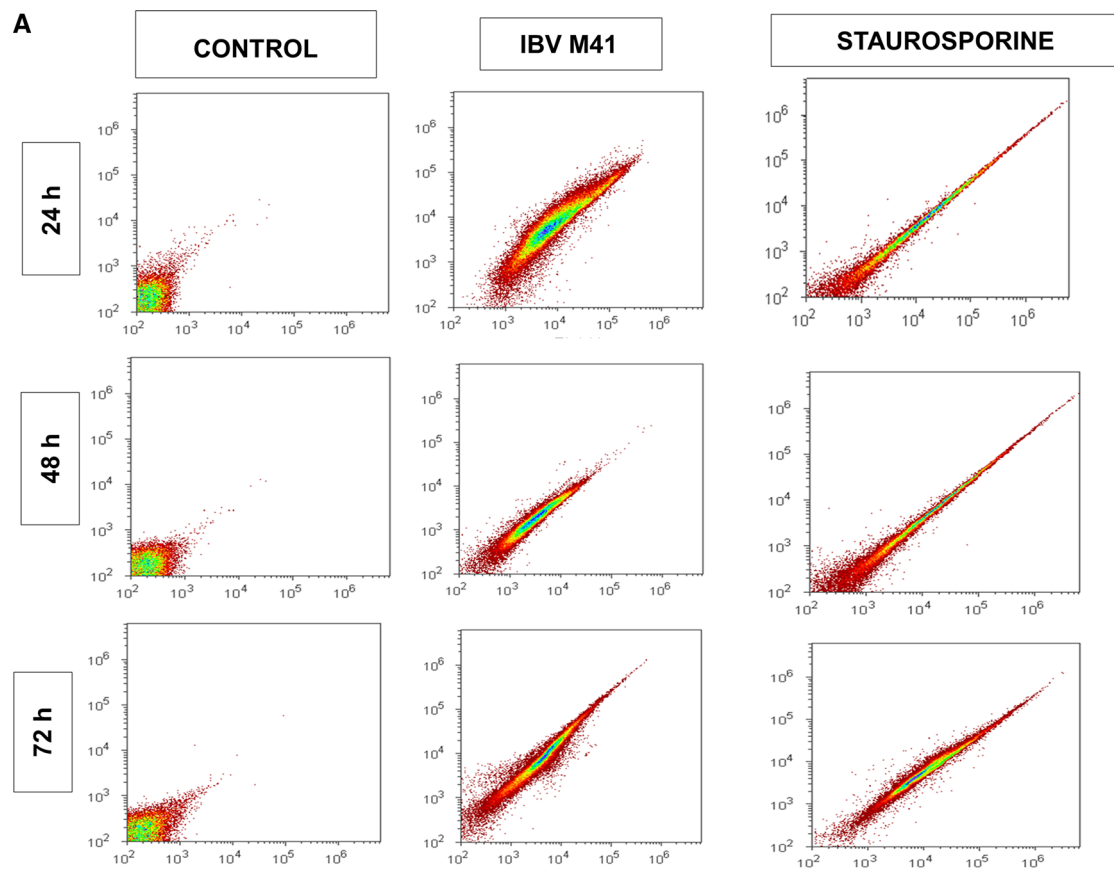


Fig. 3 A) Detection of ROS production in HD11 cells infected with the IBV M41 strain, and respective controls, by flow cytometry analysis. These data are illustrated by density dot plot graphs where the x-axis corresponds to linear amplified ROS fluorescence and the y-axis indicates logarithmic ROS fluorescence. The fluorescence emission was acquired using a BL3A filter with auto-fluorescence being excluded using a global compensation tool ($> 10^3$), in a continuous line, using an Attune acoustic focusing cytometer. B) Effects of IBV M41 infection on mitochondrial membrane depolarization at 24, 48, and 72 h p.i. The presented microphotographs are representative images of three experiments. The arrows indicate the addition of compounds: C: control (macrophages without infection) or CCCP (1 μ M of m-chlorophenylidrazone) acting as an uncoupler. C) Effects of IBV M41 infection on mitochondrial respiration at 24, 48 and 72 h p.i., showing a decrease in oxygen consumption

that increase the proton conductance of the inner mitochondrial membrane [19, 24]. IBV M41-infected macrophages demonstrated the capacity to induce ROS production at all examined times p.i., supporting the hypothesis that viral replication has a protonophoric activity in this study. During viral infection, macrophage functions may be directly compromised, affecting the immune system [22, 25]. This finding is of particular importance in poultry production, since an immunosuppressive state may lead to severe flock morbidity and mortality.

Taken together, our results indicate that IBV M41 infection acts as an uncoupler of oxidative phosphorylation, transforming the mitochondria from their normal role as an essential powerhouse in macrophage cells, and leading infected cells to undergo early apoptosis.

Acknowledgements The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Grants 2012/16715-6) for their support. TC Cardoso is recipient of CNPq (Brazilian Council for Research) fellowships and funding.

Compliance with ethical standards

Funding Fundação Amparo à Pesquisa Estado de São Paulo (grant 2012/16715-6).

Ethical approval All applicable national (COBEA 2016/3456) for care and use animals were followed.

Conflict of interest All authors declare no conflicts of interests.

References

- Amarasinghe A, Addul-Cader MS, Nazir S, De Silva Senapathi U, van der Meer F, Cork SC, Gomis S, Abdul-Careem F (2017) Infectious bronchitis coronavirus establishes productive infection in avian macrophages interfering with selected antimicrobial functions. *PLoS One* 12(8):e0181801
- Awad F, Hutton S, Forrest A, Baylis M, Ganapathy K (2016) Heterologous live infectious bronchitis virus vaccination in day-old commercial broiler chicks: clinical signs, ciliary health, immune responses and protection against variant infectious bronchitis viruses. *Avian Pathol* 45:169–177
- Barrow AD, Burgess SC, Baigent SJ, Howes K, Nair VK (2003) Infection of macrophages by a lymphotropic herpesvirus: a new tropism for Marek's disease virus. *J Gen Virol* 84:2635–2645
- Brenner MPC, Silva-Frade C, Ferrarezi MC, Garcia AF, Flores EF, Cardoso TC (2012) Evaluation of developmental changes in bovine *in vitro* produced embryos following exposure to bovine Herpesvirus type 5. *Rep Biol Endocrinol* 10:53
- Cavanagh D (2007) Coronavirus avian Infectious bronchitis virus. *Vet Rec* 38:281–297
- Chhabra R, Kuchipudi SV, Chantrey J, Ganapathy K (2016) Pathogenicity and tissue tropism of infectious bronchitis virus is associated and elevated apoptosis and innate immune responses. *Virology* 488:232–241
- Clarke P, Tyler KL (2009) Apoptosis in animal models of virus-induced disease. *Nat Rev Microbiol* 7:144–155
- Cook JK, Jackwood M, Jones RC (2012) The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathol* 41:239–250
- De Wit JJ (2000) Detection of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol* 29:71–93
- De Wit JJ, Cook JKA, van der Heijden HMJF (2011) Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol* 40:223–235
- Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35:495–516
- Fung TS, Liu DX (2014) Coronavirus infection. ER stress, apoptosis and innate immunity. *Front Microbiol* 5:296
- Geus ED, Verdelde L (2013) Regulation of macrophage and dendritic cell function by pathogens and through immunomodulation in the avian mucosa. *Dev Comp Immunol* 41:341–351
- Han X, Tian Y, Guan R, Gao W, Yang X, Zhou L, Wang H (2017) Infectious bronchitis virus infection induces apoptosis during replication in chicken macrophage HD11 cells. *Viruses* 9(8):26
- Jackwood MW (2012) Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian Dis* 56:634–641
- Li FQ, Tam JP, Liu DX (2007) Cell cycle arrest and apoptosis induced by coronavirus infectious bronchitis virus in the absence of p53. *Virology* 365:435–445
- Liu C, Xu HY, Liu DX (2001) Induction of caspase-dependent apoptosis in cultured cells by the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J Virol* 75:6402–6409
- Maier H, Britton P (2012) Involvement of autophagy in coronavirus replication. *Viruses* 4:3440–3451
- Nicotera P, Leist M, Ferrando-May E (1998) Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicology* 15:367–373
- Ohta A, Nishiyama Y (2011) Mitochondria and viruses. *Mitochondrion* 11:1–12
- Qureshi MA, Heggen CL, Hussain I (2000) Avian macrophage: effector functions in health and disease. *Dev Comp Immunol* 24:103–119
- Iain Scott (2010) The role of mitochondria in the mammalian antiviral defense system. *Mitochondrion* 10:316–320
- Skommer J, Brittain T, Raychaudhuri (2010) Bcl-2 inhibits apoptosis by increasing the time-to-death and intrinsic cell-to-cell variation in the mitochondrial pathway of cell death. *Apoptosis* 15:1223–1233
- Wallace KB, Starkov AA (2000) Mitochondrial targets of drug toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:353–388
- West AP, Shadel GS, Ghosh S (2011) Mitochondria in innate immune responses. *Nat Rev* 11:389–402

CAPÍTULO 3

EPIDEMIOLOGICAL RISK OF NON-VACCINATED FLOCKS AGAINST INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS LOCALIZED IN NORTHWESTERN SÃO PAULO, BRAZIL

Manuscrito a ser submetido no periódico
Brazilian Journal of Poultry Science

EPIDEMIOLOGICAL RISK OF NON-VACCINATED FLOCKS AGAINST INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS LOCALIZED IN NORTHWESTERN SÃO PAULO, BRAZIL

Sérgio Eustáquio Lemos da Silva^{1*}, Daise Aparecida Rossi¹, Juliana Uehara Ramos²,
Dielson da Silva Vieira², Silvia Helena Venturoli Perri², Tereza Cristina Cardoso²

1 Laboratory of Applied Animal Biotechnology, College Veterinary Medicine, UFU, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

2 Laboratory Animal Virology and cell culture, College Veterinary Medicine, UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brazil.

^{1*} Corresponding author: Sérgio Eustáquio Lemos da Silva, Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Rua Ceará, s/nº Bloco 2D – Sala 03 - Campus Umuarama - 38400-902 - Uberlândia – MG, Brasil. Phone: (64)3431-4451; E-mail: sergiolemosvet@gmail.com

ABSTRACT

The production of both eggs and meat is indicative of their protein and dietary importance. To guarantee food safety, several techniques have been used to improve the production of poultry and to decrease their susceptibility to infectious diseases, especially viruses. Infectious Bronchitis (IB) is caused by a virus that affects the respiratory system of poultry and wild birds, causing large economic losses to the poultry industry around the world. This study aimed to evaluate the seroprevalence of the virus in flocks from northwestern São Paulo, where no vaccination protocol is applied, by collecting 1000 serum samples from two regions (R1 considered industry-derived flocks; and R2 considered no-industry derived flocks). To investigate the presence of antibodies against the Infectious Bronchitis Virus (IBV), the indirect ELISA[®] serological test was used. Samples with at least one sample at OD (optical density) ≥ 0.2 were considered positive. Positivity for anti-IBV antibodies was observed in 34% of the samples, with the highest values being in R1 (41.51%) and R2 (52.63%). This study demonstrated the risk of no-IBV vaccination, since the Infectious Bronchitis Virus directly affects the production and viability of birds.

Keywords: Poultry. ELISA. Serology. IBV. Vaccination.

INTRODUCTION

Brazilian meat exports, mainly poultry, have been expanding internationally. According to the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply, by 2020, poultry is expected to make up 48.1% of world's meat exports, placing Brazil in the position of being the world's leading exporter of poultry (MAPA, 2017). On poultry farms, the high density of individuals may decrease environmental quality, decreasing poultry health (Wit *et al.*, 2011). Consequently, susceptibility to certain diseases, such as diseases affecting the respiratory system, may increase (Inoue & Castro, 2009; Wit *et al.*, 2011).

Listed on the International Organization of Epizootics (OIE), the Infectious Bronchitis Virus (IBV) causes Infectious Bronchitis in chickens and has potential detrimental effects on poultry production (Bagust, 2013). Along with IBV, there are several other diseases that can also generate economic losses, such as Newcastle's disease, avian influenza, infectious laryngotracheitis, and swollen head syndrome. To avoid problems associated with morbidity, overweight, and decreases in egg production and mortality, IBV and other vaccines should be routinely administered, following properly prescribed protocols (Liu *et al.*, 2009).

IBV infection can attack an entire flock, and it is dependent on serotype virulence and poultry age, as well as either maternal or active immunity (Landman *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2016). Immunizations for infectious bronchitis are not well understood due to the variations in virulence and the number of serotypes of IBV (Cavanagh & Gelb, 2008). The aim of the present study was to measure the risk of unvaccinated flocks through seropositivity identification in the state of São Paulo, Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Study design and sites description

The study was carried out on broiler chicken slaughterhouse unit in the Northwestern region of São Paulo, where there is no IBV vaccination protocol. A hundred broiler chickens that were at the final third of the production chain were selected, and 10 serum samples were collected from each aviary corresponding to 1000 samples. The birds were from the following commercial origin: Cobb 500, CobbSlow, Ross Ap 96 and Hubbard Flex. The birds were randomly housed that had three different pressure conditions: positive, negative and dark house. The farms were compared by their seroprevalence characteristics, and the effect of the distances between the flocks was analyzed. A 15 km distance was established as a boundary; all flocks that were within this radius were considered part of a single group, and a comparison was made among the groups with different radius distances. The sites were then divided into two groups based on the following characteristics: Region 1 (R1 industry-derived flocks), this group included 47 flocks that historically had fewer viral challenges. Most flocks were dark house or negative pressure aviaries, though a few had positive pressure, generally those that had been established for more than 25 years. This R1 was characterized by flocks with a higher degree of modernity. Region 2 (R2 no industry derived flocks), this region included 53 flocks were considered less modern, and most had been in operation for more than 25 years.

Data collection and analysis

Blood samples were collected by venipuncture (1.0 mL / bird) of the brachial vein by using a 3- mL syringe. The samples were left at room temperature for approximately 24

hours for serum precipitation, and they were then separated and stored at -20 °C. The serological analysis was performed by the BIOVET laboratory using the ELISA[®] immunoenzymatic technique through the BIOCHEK commercial kit following the manufacturer's recommendations. The test measured the number of antibodies to IBV in the serum of the flocks. The microplate bottoms were sensitized with the inactivated viral antigen for IBV. The samples were diluted and added to the bottom of the microplates to assess the presence of the anti-IBV antibody. An Elx800 reader with a 405-nm filter (BIOTEK[™]) was used to read the titration microplates. Positive serum were those that had at least one sampled seroreagent with an optical density (OD) ≥ 0.2 .

Statistical analysis

Data were analyzed in the Statistical Analysis System (SAS, 2016) software by using a chi-square (X^2) with a statistical significance of 10% ($p \leq 0.1$).

RESULTS

When comparing the seropositivity for IBV antibodies between R1 and R2, in the R1 region, 25.53% of the samples were positive, and in the R2 region, 41.51% of the samples were seropositive; thus, R2 had more seropositive samples than R1 ($p = 0.092$; Table 1).

Table 1 - Total housing seroprevalence and comparison of seroprevalence of anti-IBV antibodies regarding two different collection sites, R1 and R2 regions, using ELISA. The seropositivity was 34% from the total sample of housing.

Seroprevalence housing of anti-IBV antibodies						
Total housing			Sites			
			R1*		R2*	
ELISA	N	%	N	%	N	%
Positive	34	34	12	25.53	22	41.51
Negative	66	66	35	74.47	31	58.49
Total	100	100	47	100	53	100

*p=0.092

The seropositivity was 34% (34/100) from the total sample, having 81% (81/100) of the samples coming from integrated aviaries and 19% (19/100) from nuclei ones (Figure 1). When we analyzed the relationship between bird housing and seropositivity, there was a statistically significant difference ($p = 0.05$) between the R1 and R2, with 29.63% and 52.63% of samples testing positive in R1 and R2, respectively (Table 2). When we investigated the seroreagent aviaries and their proximity to other farms, no significant difference was observed ($p = 0.69$).

Table 2 - Comparison of seroprevalence of anti-IBV antibodies regarding the farm poultry types Integrated or Nuclei. There was difference between the R1 and R2, with 29.63% and 52.63% of samples testing positive in R1 and R2, respectively.

Farm type				
ELISA	Integrated*		Nuclei*	
	N	%	N	%
Positive	24	29.63	10	52.63
Negative	57	70.37	9	47.37
Total	81	100	19	100

*p=0.05

DISCUSSION

The presence of a brazilian genotype BR-I genotype has been reported throughout the territory of Brazil, as well as in other Latin American countries (Chacon *et al.*, 2011; Balestrin *et al.*, 2014). For this reason, this study investigated the presence of IBV in the northwestern region of São Paulo ($p < 0.1$). Extensive genetic diversity in IB viruses is found due to their fast replication and high mutation rates (Jackwood, 2013). Such considerations are extremely important for the prevention of the associated disease. Both R1 and R2 exhibited antibodies to the virus, meaning that birds from both regions, regardless of their phenotypic differences, faced the virus at some point. Pohjola *et al.* (2014) studied IBV and showed that both D274 and 4/91 genotypes of the virus were found in Finland, where no vaccination protocol has been implemented. They suggested

that these genotypes may have arrived in the country from vaccinated animals elsewhere, considering that bird migration is an important factor when studying IBV, as indicated by Pohjola *et al.* (2014). IBV in R2 could be associated with the different types of management protocols and vaccinations used in other integrated farms located in the surrounding areas. Positivity in R1, on the other hand, may have a relationship with either the presence of backyards or wild birds located in neighboring properties, since contact between wild birds and poultry producing areas has been associated with the spread and maintenance of infectious diseases (Wang *et al.*, 2013; Pohjola, 2014).

There was not an association between seroprevalence and the distances between the regions. This result may be related to regulation 56, introduced by the MAPA, which states that poultry establishments may not impose adverse conditions that could interfere with the health and well-being of the poultry and that they maintain a minimum distance of 3 km apart (MAPA, 2007). Disease can be introduced through human transit, through animal/genetic material/biological product imports, or via transmission by migratory birds (MAPA, 2013). This information reinforces that care needs to be taken with sanitary control on farms, as it is an essential part of the poultry production chain (Ribeira *et al.*, 2010). Dixon (2015) studied Egypt's agrifood industry and showed that biosafety was crucial to the control of diseases. We believe that there must be a cause and effect relationship, indicating that the presence of sanitary measures may have decreased the exposure to viruses.

The low seropositivity for anti-IBV antibodies, representing 34% of the flocks in total, suggests the need for studies on the prevention of infectious diseases in poultry production. Both health and vaccination measures can influence the immunological protection of poultry lots. Vaccine serotypes that were recently developed may be

avored by selection, mutation or recombination pressure, which needs to be considering when developing a vaccine control protocol for emergencies (Bande *et al.*, 2015).

Negative flocks are potential sources of concern, due to their probable susceptibility to the virus. Kouakou *et al.* (2015) studied the Newcastle Disease virus (VDN) and VBI and found that pathogenic agents were endemic to the country they studied, even though vaccination protocols were reported. Although commercialization of live-attenuated and inactivated vaccines for IBV is available, vaccination protocols must be carried out with caution (De Witt *et al.*, 2011). At the same time, the absence or delay in developing specific vaccines for an emergency is important to avoiding errors in the protocol (Jackwood, 2012). Thus, vaccinations and sanitary management are necessary mechanisms to ensure the quality of animals and their products.

CONCLUSION

IBV antibodies were observed in the Northwestern region of São Paulo, with higher positivity in the R2 region, which represented traditional poultry production flocks. Vaccination is an important mechanism in preventing IBV, along with adequate sanitary management, since the coronavirus is present in this region but there is no compulsory vaccination.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to express our gratitude to the BIOVET Laboratory, as well as to the integrative company that allowed the collection of research samples.

REFERENCES

Bagust TJ. Poultry health and disease control in developing countries. The role of poultry in human nutrition; 2013, 96.

Balestrin E, Fraga AP, Ikuta N, Canal CW, Fonseca AS, Lunge VR. Infectious bronchitis virus in different avian physiological systems – A field study in Brazilian poultry flocks. Poultry Science 2014; 93(8): 1922-1929.

<https://doi.org/10.3382/ps.2014-03875>

Bande, F, Arshad SS, Hair Bejo M, Moeini H, Omar AR. Progress and challenges toward the development of vaccines against avian infectious bronchitis. Journal of Immunology Research 2015; 2015.

Cavanagh D, Gelb JJ. Disease of poultry. 12 ed. In: YM Saif, editor. Infectious Bronchitis Ames: Blackwell Publishing Professional; 2008. p. 117-135.

Chacon JL, Rodrigues JN, Assayag Junior MS, Peloso C, Pedroso AC, Piantino FAJ. Epidemiological survey and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in Brazil between 2003 and 2009. Avian Pathology 2011; 40(2): 153-162.

<https://doi.org/10.1080/03079457.2010.544641>

De Meloiv CB. Bronquite infecciosa das galinhas: conhecimentos atuais, cepas e vacinas no Brasil. Ciência Rural 2009; 39(8): 2559-2566.

<https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000195>

De Wit JJ. Detection of infectious bronchitis virus. Avian pathology 2000, 29(2): 71-93.

<https://doi.org/10.1080/03079450094108>

De Wit JJ, Cook JK, Van der Heijden HM. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. Avian Pathology 2011; 40(3): 223-235.

<https://doi.org/10.1080/03079457.2011.566260>

Dixon MW. Biosecurity and the multiplication of crises in the Egyptian agri-food industry. *Geoforum* 2015; 61: 90-100.

<https://doi.org/10.1016/j.geoforum.2015.02.016>

Inoue AY, Castro AGM, Fisiopatologia do Sistema respiratório. In: Berchieri JA, Silva EN, Di Fabio J, Sesti L, Zuanaze MAF. *Doenças das aves*. 2ed. Campinas: FACTA, 2009.

Jackwood MW. Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian diseases* 2012; 56(4): 634-641.

<https://doi.org/10.1637/10227-043012-Review.1>

Jackwood MW. Immunopathology in infectious bronchitis and its role in the vaccination response. In Embrapa Suínos e Aves, editor. XIV Simpósio Brasil Sul de Avicultura e V Brasil PoultryFair ; 2013. p. 81.

Jones RC. Viral respiratory diseases (ILT, aMPV infections, IB): are they ever under control?. *British poultry science* 2010; 51(1) : 1-11.

<https://doi.org/10.1080/00071660903541378>

Kouakou AV, Kouakou V, Kouakou C, Godji P, Kouassi AL, Krou HA, Couacy-Hymann E. Prevalence of Newcastle disease virus and infectious bronchitis virus in avian influenza negative birds from live bird markets and backyard and commercial farms in Ivory-Coast. *Research in veterinary science* 2015;102: 83-88.

<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.07.015>

Ladman BS, Loupos AB, Gelb J. Infectious bronchitis virus S1 gene sequence comparison is a better predictor of challenge of immunity in chickens than serotyping by virus neutralization. *Avian Pathology* 2006;35(2) : 127-133.

<https://doi.org/10.1080/03079450600597865>

Liu XL, Su JL, Zhao JX, Zhang GZ. Complete genome sequence analysis of a predominant infectious bronchitis virus strain in China. *Virus Genes* 2009; 38: 56-65.

<https://doi.org/10.1007/s11262-008-0282-5>

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. MAPA. Plano de contingencia para influenza Aviaria e Doença de Newcastle. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Saúde Animal. Coordenação Geral de combate as doenças. Coordenadoria de Sanidade Avícola – Versão 1.4, Abril 2013. Disponível em:

http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/arquivos-das-publicacoes-de-saude-animal/plano-decontingencia-versao-1_4.pdf/view. Acesso em: 06.dezembro.2017.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. MAPA. Legislação. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method>.

Acesso em: 06.dezembro.2017.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. MAPA. Exportação. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/exportacao>. Acesso em: 22.dezembro.2017.

Pohjola LK, Ek-Kommonen SC, Tammiranta NE, Kaukonen ES, Rossow LM, Huovilainen TA. Emergence of avian infectious bronchitis in a non-vaccinating country. *Avian Pathology* 2014; 43(3) : 244-248.

<https://doi.org/10.1080/03079457.2014.913770>

Ribeira JG, Resende PT, Fernandes T, Sousa M. Percepção ambiental: Um estudo de caso na granja de galinhas poedeiras do Instituto Federal Goiano Campus Urutaí. *Revista Enciclopédia Biosfera* 2010;6(11): 01-11.

SAS Institute Inc. The SAS System, release 9.3 SAS Institute Inc., Cary: NC, 2016.

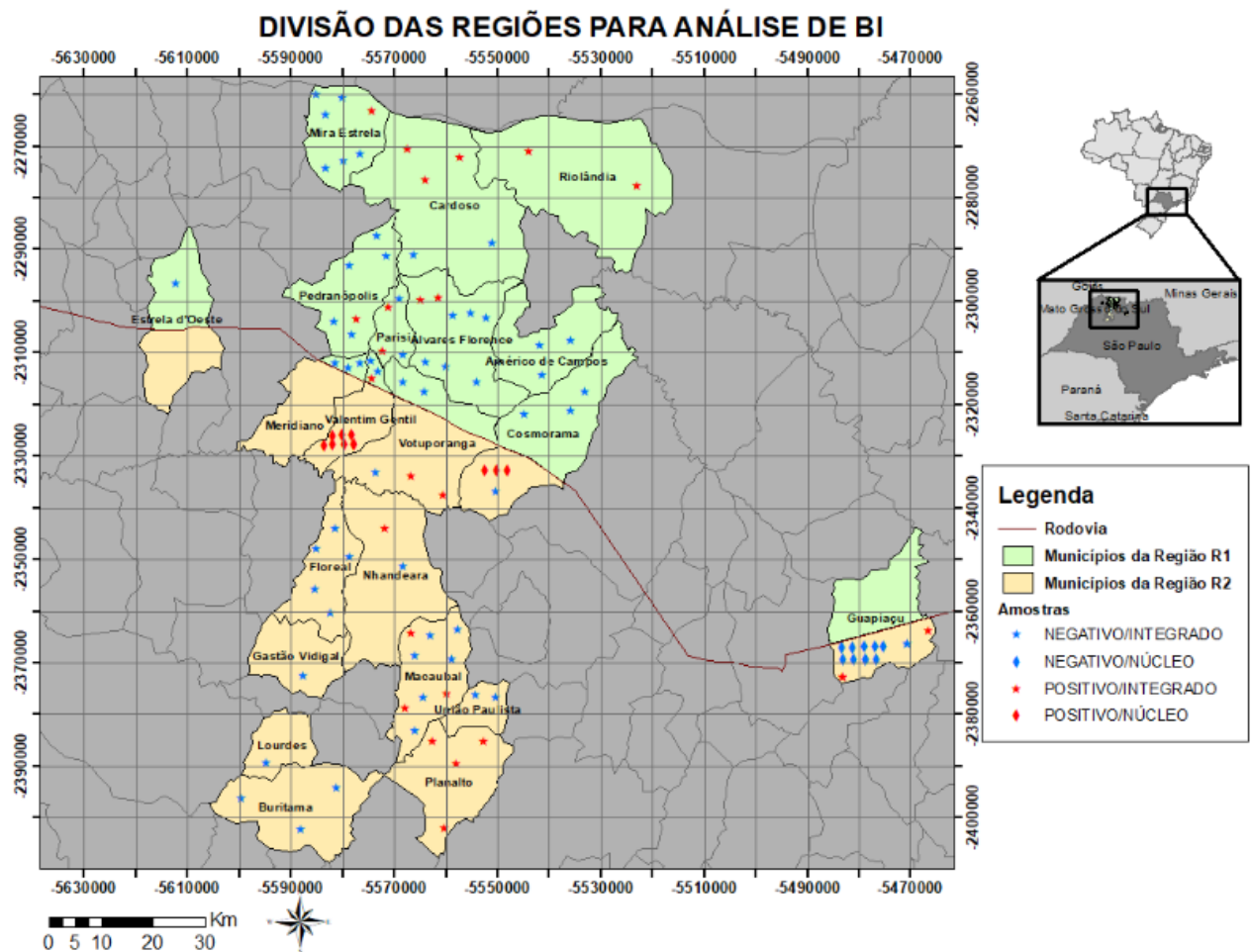
Wang Y, Jiang Z, Jin Z, Tan H, Xu B. Risk factors for infectious diseases in backyard poultry farms in the poyang lake area, china. PLoS One 2013; 8(6): e67366.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067366>

Yan SH Chen Y, Zhao J, Xu G, Zhao Y, Zhang G. Pathogenicity of a TW-Like strain of infectious bronchitis virus and evaluation of the protection induced against it by a QX-Like strain. Frontiers in Microbiology 2016; 7:1653.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01653>

Figure 1 – Map of the seroprevalence for the Infectious Bronchitis Virus at both R1 and R2 sites.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises de macrófagos aviários da linhagem HD11, infectados com a cepa Massachusetts-41 do Vírus da Bronquite Infecciosa (IBV) e avaliados por citometria de fluxo, mostraram que as células infectadas sofrem apoptose precoce que, também, foi sugerida pela evidência dos efeitos morfocitopáticos em cultivo celular. Apesar de fisiológica, a apoptose, quando ocorre de forma precoce, pode comprometer a função dos macrófagos na resposta imune inata, visto que atua como uma primeira linha de defesa do *Gallus gallus domesticus* contra o IBV. Dentro do contexto da produção de aves comerciais, essa constatação é de singular importância, uma vez que um estado de imunossupressão da ave hospedeira pode levar à morbidade e mortalidade graves do plantel.

Além da apoptose precoce nas células do sistema fagocítico mononuclear, a replicação viral levou à despolarização de membrana mitocondrial e à produção de espécies reativas de oxigênio, atuando como um desacoplador da cadeia respiratória mitocondrial, que parece induzir uma falha na produção bioenergética da célula. No entanto, como observado nos testes de imunomarcagem e titulação viral, essa depleção da produção de energia mitocondrial não comprometeu a replicação viral e isso, certamente, pode favorecer a disseminação do IBV dentro de um sistema de produção avícola.

Os resultados deste estudo permitem desdobramentos no futuro, semelhantes aos realizados por Qi et al. (2017). É instigante conhecer o efeito de lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* sobre macrófagos aviários da linhagem HD11 infectados com a estirpe Mass-41 do IBV, com foco na comparação dos processos de apoptose induzidos pelo IBV e a co-estimulação bacteriana. Estudos adicionais da expressão de genes pró-inflamatórios e anti-IBV também são necessários, e permitirão investigar a modulação da resposta imune inata dos macrófagos ao IBV.

Em relação à investigação da imunidade adaptativa humoral ao IBV, o teste de ELISA indireto apontou para o risco da não vacinação contra esse agente viral, ao detectar anticorpos contra IBV em aves criadas em sistemas de produção com algum grau de modernidade e que não praticam vacinação contra a Bronquite Infecciosa. A

vacinação, juntamente com um manejo sanitário adequado, é um mecanismo simples, eficaz e necessário na prevenção do IBV, uma vez que o vírus está presente em regiões com alta densidade avícola e sem vacinação compulsória.

Como perspectivas e desdobramentos da segunda investigação, podemos sugerir estudos que envolvam o isolamento e análise da diversidade genética de estirpes circulantes na região investigada e analisar macrófagos infectados *in vivo*. Ainda, seria interessante e relevante executar um projeto extensionista, com o objetivo de promover ações de sensibilização para a importância da vacinação contra o IBV em áreas de alta densidade avícola, de forma integrada entre o serviço veterinário oficial, empresas avícolas e criadores de aves de fundo de quintal.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. et al. **Imunologia Celular e Molecular**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008, 564p.

ABD EL, R. S., et al. Comparative analysis of the sialic acid binding activity and the tropism for the respiratory epithelium of four different strains of avian infectious bronchitis virus. **Avian Pathol.**, v. 38, p. 41-45, 2009.
<https://doi.org/10.1080/03079450802632049>

ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. **Princípios e técnicas de diagnose em virologia**. Brasília/Fortaleza: Publicação SBF, 2001, 186p.

AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Sciences**, v. 75, p.639-653, 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.10.042>

AL-SHEKAILI, T. et al. Molecular detection of infectious bronchitis and avian metapneumoviruses in Oman backyard poultry. **Research in Veterinary Science**, v. 99, p. 46-52, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.12.018>

ARIAANS, M. P. et al. The role of phagocytic cells in enhanced susceptibility of broilers to colibacillosis after infectious bronchitis virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, p. 240-250, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.02.003>

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

BALESTRIN, E. et al. Infectious bronchitis virus in different avian physiological systems: A field study in Brazilian poultry flocks. **Poultry Science**, v. 93, n. 8, p. 1922-1929, 2014.
<https://doi.org/10.3382/ps.2014-03875>

BECTON, B. D. Dickinson and Company. **Introduction to Flow Cytometry: a learning guide**. San José: BD, 2000.

BELOUZARD, S. et al. Mechanisms of Coronavirus Cell Entry Mediated by the Viral Spike Protein. **Viruses**, v. 4, n. 6, p. 1011-1033, jun. 2012.
<https://doi.org/10.3390/v4061011>

BERGMANN, C. C. et al. Coronavirus infection of the central nervous system: host-virus stand-off. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 121-132, fev. 2006.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1343>

BEUG, H. et al. Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. **Cell**, v. 18, p. 375-390, 1979.

[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90057-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90057-6)

BIJLENGA et al. Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: a review. **Avian Pathol.**, v. 33, n. 6, p. 550-557, 2004.

<https://doi.org/10.1080/03079450400013154>

BOSCH, B. J. et al. The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. **Journal of Virology**, v. 77, n. 16, p. 8801-8811, 2003.

<https://doi.org/10.1128/JVI.77.16.8801-8811.2003>

BOUROGÂA, et al. A Characterization of New Variants of Avian Infectious Bronchitis Virus in Tunisia. **Avian Diseases**, v. 53, p. 426-433, 2009.

<https://doi.org/10.1637/8666-022609-Reg.1>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N. 50, de 24 de Setembro de 2013. 2013. Disponível em:

<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saudeanimal/arquivos-das-publicacoes-de-saude-animal/Listadoencomasanimaisdenotificacaoobrigatoria.pdf>. Acesso em 10.06.2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Exportação. 2017.

Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/exportacao>. Acesso em 10.07.2017.

BROOKS, J. E. et al. Comparisons of envelope through 5B sequences of infectious bronchitis coronaviruses indicates recombination occurs in the envelope and membrane genes. **Virus Res.**, v. 100, p.191-198, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.11.016>

BROWN, L. et al. Recommendations for the evaluation of specimen stability for flow cytometric testing during drug development. **Journal of Immunological Methods**, v.418, p.1-8, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.01.008>

BROWNLIE, R.; ALLAN, B. Avian toll-like receptors review. **Cell tissue research**, v. 343, n. 7, p. 121-130, 2011.

<https://doi.org/10.1007/s00441-010-1026-0>

CAMPBELL, T. W. Hematology of birds. In: THRALL, M. A. **Veterinary hematology and clinical chemistry**. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2004, 601p.

CARDOSO, T. C. et al. Estudo comparativo de três diferentes modalidades de ELISA para medir os anticorpos contra o vírus da bronquite infecciosa em frangos vacinados e não vacinados. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 3, n. 1, p. 89-101, jan-abr. 2001.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. Interação entre imunidade e nutrição das aves: revisão de literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, n. 24, p. 23-24, jan. 2015.

CARON, L. F. O sistema imune das aves e a resposta às vacinações. In: Curso de sanidade avícola, Jaguariúna, SP. **Anais Jaguariúna**: 2008, p.97-110.

CARON, L. F. Etiology and Immunology of Infectious Bronchitis Virus. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 12, n. 2, p. 115-119, 2010.
<https://doi.org/10.1590/S1516-635X2010000200007>

CASAIS, R. et al. Gene 5 of the Avian Coronavirus Infectious Bronchitis Virus Is Not Essential for Replication. **Journal of Virology**, v. 79, n. 13, p. 8065-8078, jul. 2005.
<https://doi.org/10.1128/JVI.79.13.8065-8078.2005>

CAVANAGH, D. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis virus. **Avian Pathology**, v. 32, p. 567-582, 2003.
<https://doi.org/10.1080/03079450310001621198>

CAVANAGH, D. Coronaviruses in poultry and other birds. **Avian Pathology**, v. 34, n. 6, p. 439-448, 2005.
<https://doi.org/10.1080/03079450500367682>

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Veterinary Research**, v. 38, n. 2, p. 281-97, fev. 2007.
<https://doi.org/10.1051/vetres:2006055>

CAVANAGH, D. et al. Location of the amino-acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of closely related serotypes of infectious-bronchitis virus, **Avian Pathology**, v. 21, p. 33-43, 1992.
<https://doi.org/10.1080/03079459208418816>

CAVANAGH, D. et al. Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of crossprotection in vivo. **Avian Pathology**, v. 26, p.63-74, 1997.
<https://doi.org/10.1080/03079459708419194>

CAVANAGH, D. et al. Detection of a coronavirus from turkey poult in Europe genetically related to infectious bronchitis virus of chickens. **Avian Pathology**, v. 30, p. 365-378, 2001.
<https://doi.org/10.1080/03079450120066368>

CAVANAGH, D. et al. Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys. **Avian Pathology**, v. 31, p. 181-193, 2002.
<https://doi.org/10.1080/03079450120106651>

CAVANAGH, D. et al. Variation in the spike protein of the 793/B type of infectious bronchitis virus, in the field and during alternate passage in chickens and embryonated eggs. **Avian Pathology**, v. 34, p. 20-25, 2005.
<https://doi.org/10.1080/03079450400025414>

CAVANAGH, D.; NAQI, S. Infectious Bronchitis. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W. **Diseases of poultry**. 11. ed. Ames: Iowa State University Press, 2003, 439p.

CHACANA, P. A. et al. Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. **Revista de Medicina Veterinaria**, v. 85, p. 179-189, 2004.

CHACON, J. L. et al. Epidemiological survey and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in Brazil between 2003 and 2009. **Avian Pathology**, v. 40, n. 2, p. 153-162, 2011.
<https://doi.org/10.1080/03079457.2010.544641>

CHANG, Y. C. et al. Association study of the genetic polymorphisms of the transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) gene and type 2 diabetes in the Chinese population. **Diabetes**, v. 56, p. 2631-2637, 2007.
<https://doi.org/10.2337/db07-0421>

CHHABRA, R. et al. Pathogenicity and tissue tropism of infectious bronchitis virus is associated with elevated apoptosis and innate immune responses. **Virology**, v. 488, p. 232-241, jan. 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.11.011>

CHU, D. K. W. et al. Coronaviruses in bent-winged bats (*Miniopterus* spp.). **J. Gen. Virol.**, 87, 2461-2466, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.11.011>

COOK, J. K. A. et al. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. **Avian Pathology**, v. 41, p. 239-250, 2012.
<https://doi.org/10.1080/03079457.2012.680432>

CÔRTE-REAL M, et al. Contribuições da citologia analítica para estudos de biologia de leveduras. **Bol. Biotec.**, v. 71, p. 19-33, 2002.

CUZZOCREA, S. et al. Inhibitor I reduces the development of acute and chronic inflammation. **American Journal of Pathology**, v. 157, n. 6, p. 112-125, 2000.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64845-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64845-6)

DAVISON, F. The importance of the avian immune system and its unique features. In: **Avian Immunology**. 1. ed. San Diego: Elsevier, 2008. cap.1, p. 1-11.
<https://doi.org/10.1016/B978-012370634-8.50004-4>

DE GEUS, E. D. et al. Uptake of particulate antigens in a nonmammalian lung: phenotypic and functional characterization of avian respiratory phagocytes using bacterial or viral antigens. **J. Immunol.** v. 188, p. 4516-4526, 2012.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200092>

DE GEUS, E. D.; VERVELDE, L. Regulation of macrophage and dendritic cell function by pathogens and through immunomodulation in the avian mucosa. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 41, n. 3, p. 341-351, mar. 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.03.008>

DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. Canine coronavirus: not only an enteric pathogen. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v. 41, p. 1121-1132, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.07.005>

DE WITT, J. J. Detection of infectious bronchitis virus. **Avian Pathology**, v. 29, p. 71-93, 2000.
<https://doi.org/10.1080/03079450094108>

DHAMA, K. et al. Emergence of Avian Infectious bronchitis virus and its variants need better diagnosis, prevention and control strategies: a global perspective. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 17, p. 751-767, 2014.
<https://doi.org/10.3923/pjbs.2014.751.767>

DI FÁBIO, J.; ROSSINI, L. I. Bronquite infecciosa das galinhas. In: BERCHIERI, A.J.; MACARI, M. **Doenças das aves**. 3. ed. Campinas: FACTA, 2000. p.293-300.

DI FABIO, J. et al. Characterization of infectious bronchitis viruses isolated from outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. **Avian Dis.**, v. 44, n. 3, p. 582-589, 2000.
<https://doi.org/10.2307/1593097>

DOLZ, R. J. et al. New insights on infectious bronchitis virus pathogenesis: Characterization of Italy two serotype in chicks and adult hens. **Vet. Microbiol.**, v. 156, n. 3, p. 256-264, mai. 2012.

DU, L. et al. The evolution of guidelines for the validation of flow cytometric methods. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 37, p. 3-10, 2015.
<https://doi.org/10.1111/ijlh.12344>

ERF, G. F. Cell-mediated immunity in poultry. **Poultry Science**, v. 83, p. 580-590, 2008.
<https://doi.org/10.1093/ps/83.4.580>

FALDYNA, M. et al. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs – a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 82, n. 1-2, p. 23-37, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(01\)00337-3](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(01)00337-3)

FEHR, A. R.; PERLMAN, S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. **Methods in molecular biology**, v. 1282, p. 1-23, 2015.

https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1

FERNANDO, F. S. et al. Caracterização da atividade biológica de um novo isolado de campo do vírus da bronquite infecciosa das galinhas. **O Biológico**, v. 72, p. 106-111, 2010.

FERNANDO, F. S. et al. Nephritis associated with a S1 variant brazilian isolate of infectious bronchitis virus and vaccine protection test in experimentally infected chickens. **Int. J. Poult. Sci.**, v. 12, n. 11, p. 639-646, 2013.

<https://doi.org/10.3923/ijps.2013.639.646>

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária. Virologia Geral e Doenças Víricas**. 2ed. Santa Maria: UFSM. 2012. p. 54-82.

FUNG, T. S; LIU, D. X. Coronavirus infection, ER stress, apoptosis and innate immunity. **Front. Microbiol.**, v. 5, p. 283-296, 2014.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00296>

GALLAGHER, T. M.; BUCHMEIERT, M. J. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. **Virology**, v. 279, p. 371-374, 2001.

<https://doi.org/10.1006/viro.2000.0757>

GEISSMANN, F. et al. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, p. 453-460, 2010.

<https://doi.org/10.1038/nri2784>

GEUS, E. D.; VERVELDE, L. Regulation of macrophage and dendritic cell function by pathogens and through immunomodulation in the avian mucosa. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 41, p. 341-351, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.03.008>

GIBERTONI, A. M.; MONTASSIER, H. J. Development and application of a *Saccharomyces cerevisiae*-expressed nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against Infectious Bronchitis Virus. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n.4, p. 1982-1984, 2005.

<https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1982-1984.2005>

GÓES, L. G. B. et al. Coronavirus HKU1 in Children, Brazil, 1995. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 6, p. 1147-1148, 2011.

GORDON, S. Pattern recognition receptors: Minireview doubling up for the innate immune response. **Cell**, v. 111, n. 7, p. 927-930, 2002.

[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01201-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01201-1)

- GORDON, D. et al. Child Poverty in the Developing World. **J. of Europ. Soc. Pol.**, v. 5, n. p. 111-129, 2003.
- GREEN, R.; WACHSMANN-HOGIU, S. Development, History, and Future of Automated Cell Counters. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 35, p.1-10, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.cll.2014.11.003>
- GUO, X. et al. Molecular mechanisms of primary and secondary mucosal immunity using avian infectious bronchitis virus as a model system. **Vet. Immunol. and Immunopathol.**, v. 121, n. 3, p. 332-343, out. 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.09.016>
- GUY, J. S. Turkey coronavirus is more closely related to avian infectious bronchitis virus than to mammalian coronaviruses. **Avian Pathology**, v. 29, p. 206-212, 2000.
<https://doi.org/10.1080/03079450050045459>
- HALLMAN, M. et al. Toll-like receptors as sensors of pathogens. **Pediatric research**, v. 50, n. 3, p. 315-326, set. 2001.
<https://doi.org/10.1203/00006450-200109000-00004>
- HE, J. B. et al. Deficits in early-stage face perception in excessive internet users. **Cyberpsychol. Behav. Soc. Netw.**, v. 14, p. 303-308, 2011.
<https://doi.org/10.1089/cyber.2009.0333>
- HIPÓLITO, O. O isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil. **Arquivo Escola Veterinária Universidade de Minas Gerais**, v. 10, p. 131-151, 1957.
- HIPÓLITO, O. et al. Estudos de duas amostras de vírus isoladas de casos da “síndrome nefrite-nefrose” das galinhas no Brasil. **Ciênc. Cult.**, São Paulo, v. 25, p. 569-581, 1973.
- HOLMES, K. V. et al. SARS coronavirus: a new challenge for prevention and therapy. **J. Clin. Invest.**, v. 111, p. 1605-1609, 2003.
<https://doi.org/10.1172/JCI18819>
- HOLT, D. E. et. al. Serologic prevalence of antibodies against canine influenza virus (H3N8) in dogs in a metropolitan animal shelter. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 237, p. 71-73, 2010.
<https://doi.org/10.2460/javma.237.1.71>
- ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses. **Virus Taxonomy: 2015 Release**. 2015. Disponível em: <http://ictvonline.org/virustaxonomy.asp>. Acesso em: 15.06.2017.

INOUE, A. Y.; CASTRO, A. G. M. Fisiopatologia do sistema respiratório. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, L.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das Aves**. 2. Ed. Campinas: FACTA, 2009.

ITO, N. K. et al. Controle de variantes do vírus da bronquite infecciosa das galinhas. **Anais da Conferência APINCO**, v. 1, p. 75-99, 2006.

JANEWAY, C. A. J. R. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 3. ed. São Paulo: Artmed, 2000.

JANEWAY, C. A. J. R. How the immune system protects the host from infection. **Microbes Infect.**, v. 3, p. 1167-1171, 2001.

JACKWOOD, M. W. et al. Infectious bronchitis virus field vaccination coverage and persistence of Arkansas-type viruses in commercial broilers. **Avian Diseases**, v. 53, p. 175-183, 2009.

<https://doi.org/10.1637/8465-090308-Reg.1>

JACKWOOD, M. W. et al. Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 1305-1311, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.05.003>

JACKWOOD, M. W. Immunopathology in infectious bronchitis and its role in the vaccination response. In Embrapa Suínos e Aves, editor. XIV **Simposio Brasil Sul de Avicultura e V Brasil PoultryFair**, 2013. 81p.

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.

<https://doi.org/10.1080/00071660903541378>

JORGENSEN, I. et al. Programmed cell death as a defence against infection. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 17, n. 3, p. 151-164, mar. 2017.

<https://doi.org/10.1038/nri.2016.147>

KAISER, P. Advances in avian immunology - prospects for disease control: a review. **Avian pathology**, v. 39, n. 5, p. 309-324, 2010.

<https://doi.org/10.1080/03079457.2010.508777>

KAMEKA, A. M. et al. Induction of innate immune response following infectious bronchitis corona virus infection in the respiratory tract of chickens. **Virology**, v. 450, p. 114-121, jan. 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.12.001>

KAPLOWITZ, N. Cell death at the millennium. Implications for liver diseases. **Clin. Liver Dis.**, v. 4, p. 1-23, 2000.

[https://doi.org/10.1016/S1089-3261\(05\)70094-5](https://doi.org/10.1016/S1089-3261(05)70094-5)

KAUFMANN, A. et al. Defense against influenza A virus infection: essential role of the chemokine system. **Immunobiology**, v. 204, p. 603-613, 2001.
<https://doi.org/10.1078/0171-2985-00099>

KJAERUP, R. M. et al. Characterization of cellular and humoral immune responses after IBV infection in chicken lines differing in MBL serum concentration. **Viral Immunol.**, v. 27, n. 10, p. 529-542, dez. 2014.
<https://doi.org/10.1089/vim.2014.0088>

KRZYZOWSKA, M. et al. Involvement of Fas and FasL in Ectromelia virus-induced apoptosis in mouse brain. **Virus Research**, v. 115, p. 141-149, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.08.001>

KRZYZOWSKA, M. et al. Role of Fas/FasLin regulation of inflammation in vaginal tissue during HSV-2 infection. **Cell death and Disease**, v. 2, p. 124-132, 2011.
<https://doi.org/10.1038/cddis.2011.14>

KUO, L.; MASTERS, P. S. The small envelope protein E is not essential for murine coronavirus replication. **J. Virol.**, v. 77, p. 4597-4608, 2003.
<https://doi.org/10.1128/JVI.77.8.4597-4608.2003>

KUMAR, H. et al. Pathogen recognition in innate response. **Biochemistry Journal**, v. 420, p. 1-16, 2009.

LAI, M. M. C.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 48, n.1, p. 88-100, 1997.
[https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60286-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60286-9)

LAI, M.M.C. et al. Coronaviridae. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M.A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. **Fields Virology**. 5. ed. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2007.

LIAO, H. et al. FasL/Fas pathway is involved in Dengue virus induced apoptosis of the vascular endothelial cells. **Journal of Medical Virology**, v. 82, p. 1392-1399, 2010.
<https://doi.org/10.1002/jmv.21815>

LILLEHOJ, H. S.; LI, G. Nitric oxide production by macrophages stimulated with coccidia sporozoites, lipopolysaccharide, or interferon-gamma, and its dynamic changes in SC and TK strains of chickens infected with Eimeria tenella. **Avian Diseases**, v. 48, p. 244-253, 2004.
<https://doi.org/10.1637/7054>

LIU, Q. et al. Secondary structural elements within the 3' untranslated region of mouse hepatitis virus strain JHM genomic RNA. **J. Virol.**, v. 75, p. 12105-12113, 2001.
<https://doi.org/10.1128/JVI.75.24.12105-12113.2001>

LIU, S. et al. Evaluation of the protection conferred by commercial vaccines and attenuated heterologous isolates in China against the CK/CH/LDL/971 strain of infectious bronchitis coronavirus. **Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 130-136, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.018>

LOHARUNGSIKUL, S. et al. Expression of toll-like receptors on antigen-presenting cells in patients with *Falciparum* malaria. **Acta Trop.**, v. 105, p. 10-15, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.08.002>

LORENZI, T. F. **Manual de Hematologia. Propedêutica e Clínica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2003.

MA, H. et al. Genetic diversity of avian infectious bronchitis coronavirus in recent years in China. **Avian Dis.**, v. 56, n. 1, p. 15-28, mar. 2012.
<https://doi.org/10.1637/9804-052011-Reg.1>

MACARI, M. et al. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2. ed. São Paulo: FUNEP, 2002.

MACHADO, P. R. L. et al. Immune response mechanisms to infections. **An. Bras. Dermatol.**, v. 79, n. 6, p. 647-664, nov. 2004.
<https://doi.org/10.1590/S0365-05962004000600002>

MADRUGA, C. R. et al. **Princípios, padronização e validação de provas sorológicas**. In: **Imunodiagnóstico em medicina Veterinária**. Editora: EMBRAPA gado de corte, 2001, 175p.

MAINA, J. N. Some recent advances on the study and understanding of the functional design of the avian lung: morphological and morphometric perspectives. **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.**, v. 77, p. 97-152, 2002.
<https://doi.org/10.1017/S1464793101005838>

MASTERS, P. S.; PERLMAN, S. 2013. Coronaviridae. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M., COHEN, J. I.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; RacAniello, V. R.; ROIZMAN, B. (Ed). **Fields virology**. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2013, v.1, p. 825-858.

MCKINLEY, E. T. et al. Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. **Vaccine**, v. 26, p 1274-1284, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.01.006>

MCKINLEY, E. T. et al. Attenuated live vaccine usage affects accurate measures of virus diversity and mutation rates in avian coronavirus infectious bronchitis virus. **Virus Res.**, v. 158, p. 225-234, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.04.006>

MEEUSEN, E. N. et al. Current status of veterinary vaccines. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 20, p. 489-510, 2007.

MENDONÇA, J. F. P. et al. Bronquite infecciosa das galinhas: conhecimentos atuais, cepas e vacinas no Brasil. **Cienc. Rural**, v. 39, n. 8, p. 2559-2566, out. 2009.
<https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000195>

MONTASSIER, M. F. S. et al. Genetic grouping of avian infectious bronchitis virus isolated in Brazil based on RT-PCR/RFLP analysis of the S1 gene. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, p. 190-194, 2008.
<https://doi.org/10.1590/S0100-736X2008000300011>

MONTASSIER, H. J. Molecular Epidemiology and Evolution of Avian Infectious Bronchitis Virus. **Rev. bras. Ciên. Avícola**, v. 12, n. 2, p.87-96, 2010.

MORGULIS, M. S. Imunologia Aplicada. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZÁLEZ, E. **Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte. Jaboticabal**: FUNEP/UNESP, p. 231-245, 2002.

MUÑIZ, F. G. et al. Evaluación de tres protocolos de vacunación de explotaciones de pollo de engorda en el altiplano mexicano, mediante detección de anticuerpos y protección ante un desafío controlado con el virus de bronquites infecciosa. **Vet. Méx**, v. 31, n. 2, p. 123-136, 2000.

MURMANN, J. P. Knowledge and Competitive Advantage in the Synthetic Dye Industry, 1850-1914: The coevolution of firms, technology, and national institutions in Great Britain, Germany, and the United States. 1. ed. New York: **Cambridge University Press**, p. 763-988, 2007.

MURPHY, F. A. et al. **Veterinary virology**. 3 ed. Califórnia: Academic, 1999. 629p.

MURPHY, Kenneth. **Imunobiologia de Janeway-8**. Artmed Editora, 2014. 425p.

NAKAGE, A. P. M. et al. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 966-973, jul-ago. 2005.

NEUMAN, B. W. et al. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. **J. Struct. Biol.**, v. 174, p. 11-22, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.11.021>

O'DONNELL, E. A. et al. Multiparameter flow cytometry: advances in high resolution analysis. **Immune Network Research**, v. 13, n. 2, p. 43- 54, 2013.
<https://doi.org/10.4110/in.2013.13.2.43>

OIE - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. Chapter 2.3.5. Avian infectious bronchitis. In: **Terrestrial Manual**. Paris: OIE, 2013.

OIE - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. **OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2018**. 2018. Disponível em: <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2018/>. Acesso em 05.03.2018.

OKINO, C. H. et al. Early immune responses and development of pathogenesis of avian infectious bronchitis viruses with different virulence profiles. **Plos One**, v. 12, n. 2, p. 1-17, 2017.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172275>

OOI, L. G. et al. Lactobacillus gasseri [corrected] CHO-220 and inulin reduced plasma total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol via alteration of lipid transporters. **J. Dairy Sci.**, v. 93, n. 11, p. 5048-5058, nov. 2010.
<https://doi.org/10.3168/jds.2010-3311>

PALM, N. W.; MEDZHITOV, R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. **Immunol. Rev.** v. 227, n. 1, p. 221-233, jan. 2009.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00731.x>

PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. M. MCP como um mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arq. Gastroenterol.**, v. 3, p. 138-144, 2001.
<https://doi.org/10.1590/S0004-28032001000200011>

PEREIRA, N. A. et al. Uma nova estirpe brasileira do vírus da bronquite infecciosa causadora de lesões gonadais e a proteção cruzada induzida pela vacina comercial atenuada. **O Biológico, São Paulo**, v. 68, supl. 2, p.250-254, 2006.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

POLLARD, T. D. et al. **Biologia celular**. 1ª ed. Elsevier, 2006.

POONIA, B. et al. Role of the Fas/FasL pathway in HIV or SIV disease. **Retrovirology**, v. 6, p. 88-100, 2009.
<https://doi.org/10.1186/1742-4690-6-91>

QI, X. et al. Modulation of the innate immune-related genes expression in H9N2 avian influenza virus-infected chicken macrophage-like cells (HD11) in response to Escherichia coli LPS stimulation. **Research in Veterinary Science**, v. 111, p. 36-42, abr. 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.11.008>

QURESHI, M. A. et al. Avian macrophage: effector functions in health and disease. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 24, p. 103-119, 2000.
[https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(99\)00067-1](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00067-1)

RATCLIFFE, M. J. B cell development in gut associated lymphoid tissues. **Veterinary Immunology**, v. 10, n. 87, p. 337-340, 2002.

[https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00061-2](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00061-2)

RAUW, F. et al. Humoral, cell-mediated and mucosal immunity induced by oculo-nasal vaccination of one-day-old SPF and conventional layer chicks with two different live Newcastle disease vaccines. **Vaccine**, v. 27, n. 27, p. 3631-3642, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.03.068>

REEMERS, S. S. et al. Reduced immune reaction prevents immunopathology after challenge with avian influenza virus: a transcriptomics analysis of adjuvanted vaccines. **Vaccine**, v. 28, p.6351-6360, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.06.099>

REESE, S. et al. The avian lung-associated immune system: a review. **Vet. Res.**, v. 37, p. 311-324, 2006.

<https://doi.org/10.1051/vetres:2006003>

RILEY, R. **Principles and Applications of Flow Cytometry**. 2005. Rio de Janeiro: Saúde, 2006. 489p.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Patologia: bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, p. 1480.

ROITT, I. et al. **Imunologia**. São Paulo: Manole, 1999. p. 424.

SAIKATENDU, K.S. et al. Ribonucleocapsid formation of SARS-CoV through molecular action of the N-terminal domain of N protein. **J. Virol.**, v. 81, n. 8, p. 3913-3921, abr. 2007.

<https://doi.org/10.1128/JVI.02236-06>

SAWICKI, S. G., D. L. et al. A contemporary view of coronavirus transcription. **J. Virol.**, v. 81, p. 20-49, 2007.

<https://doi.org/10.1128/JVI.01358-06>

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

SCOTT, I. The role of mitochondria in the mammalian antiviral defense system. **Mitochondrion**, v. 10, p. 316-320, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.02.005>

SILVA, E. N. Infectious Bronchitis in Brazilian chickens: current data and observations of field service personnel. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 12, n. 3, p. 197-203, 2010.

<https://doi.org/10.1590/S1516-635X2010000300009>

SMITH, E. C.; DENISON, M. R. Implications of altered replication fidelity on the evolution and pathogenesis of coronaviruses. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 5, p. 519-524, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.07.005>

SMITH, J. et al. The early immune response to infection of chickens with Infectious Bronchitis Virus (IBV) in susceptible and resistant birds. **Veterinary Research**, v. 11, p. 256-270, 2015.

<https://doi.org/10.1186/s12917-015-0575-6>

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Innate immunity to virus infection. **Immunol. Rev.**, v. 227, n. 1, p. 75-86, jan. 2009.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00737.x>

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6ed. São Paulo: Roca, 2010.

STADLER, K. et al. SARS-beginning to understand a new virus. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 1, n. 3, p. 209-218, 2003.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro775>

TATE, M. D. et al. Critical role of airway macrophages in modulating disease severity during influenza virus infection of mice. **J. Virol.**, v. 84, p. 7569–7580, 2010.

<https://doi.org/10.1128/JVI.00291-10>

TAYLOR, P. R. et al. Macrophage receptors and immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 901-944, 2005.

<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115816>

TELFORD, W. G. Near infrared lasers in flow cytometry. **Elsevier Academic Press Inc**, v. 82, p. 12-20, 2015.

TEVA, A. et al. Imunologia. In: MOLINARO (Ed.) **Conceitos e Métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. 1 ed. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, p.1-124, 2009.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

TWIGG, H. L. et al. Macrophages in innate and acquired immunity. **Seminars in Respiratory Critical Care Medicine**, v. 25, p. 21-31, 2004.

<https://doi.org/10.1055/s-2004-822302>

VALOSKY, J. et al. Induction of mucosal B-cell memory by intranasal immunization of mice with respiratory syncytial virus. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 12, p. 171-179, 2005.

<https://doi.org/10.1128/CDLI.12.1.171-179.2005>

VERVELDE, L. et al. Chicken dendritic cells are susceptible to highly pathogenic avian influenza viruses which induce strong cytokine responses. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 39, n. 3, p. 198-206, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.10.011>

VIDAL, C. E. S; RAZIA, L. E. Interpretação dos resultados de testes ELISA para o diagnóstico de doenças. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária-UFMG**, n.27, p.514, 2006.

VIERTLBOECK, B.; GOBEL, T. W. F. Avian T cells: antigen recognition and lipenges. In: DAVISON, F. (Ed.). **Avian Immunology**. London: Elsevier. Cap.5, p. 91-105, 2008.

WANG, X. et al. Transcriptome of Local Innate and Adaptive Immunity during Early Phase of Infectious Bronchitis Viral Infection. **Viral Immunol.**, v. 19, n. 4, p. 768-774, 2006.

<https://doi.org/10.1089/vim.2006.19.768>

WEISS, S. R.; NAVAS-MARTIN, S. Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 4, p. 635-664, dez. 2005.

<https://doi.org/10.1128/MMBR.69.4.635-664.2005>

WEST, A. P. et al. Mitochondria in innate immune responses. **Nature Rev.**, v. 11, p. 389-402, 2011.

<https://doi.org/10.1038/nri2975>

WEVERS, B. A.; VAN DER HOEK, L. Recently discovered human coronaviruses. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 29, n. 4, p. 715-724, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.07.007>

WICKRAMASINGHE, I. N. A. et al. Binding of avian coronavirus spike proteins to host factors reflects virus tropism and pathogenicity. **Journal of Virology**, v. 85, n. 17, p. 8903-8912, 2011.

<https://doi.org/10.1128/JVI.05112-11>

WINTER, C. Infection of the tracheal epithelium by infectious bronchitis virus is sialic acid dependent. **Microbes Infect.**, v. 10, p. 367-373, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.12.009>

WITT, J. J. et al. Infectious Bronchitis Virus in Asia, Africa, Australia and Latin America - History, Current Situation and Control Measures. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 12, n. 2, p. 97-106, abr-mai. 2010.

WITT, J. J. et al. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. **Avian Pathology**, v. 40, p. 223-235, 2011.

<https://doi.org/10.1080/03079457.2011.566260>

WOO, P. C. Y. et al. Comparative analysis of complete genome sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus. **J. Virol.**, v. 83, p. 908-917, 2009.

<https://doi.org/10.1128/JVI.01977-08>

WOO, P. C. et al. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. **Exp. Biol. Med.**, v. 234, p. 1117-1127, 2009.
<https://doi.org/10.3181/0903-MR-94>

WOO, P.C. et al. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. **Viruses**, v. 2, p. 1804-1820, 2010.
<https://doi.org/10.3390/v2081803>

WOO, P. C. et al. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. **J. Virol.**, v. 86, p. 3995-4008, 2012.
<https://doi.org/10.1128/JVI.06540-11>

XING, Z. et al. Modulation of the immune responses in chickens by low-pathogenicity avian influenza virus H9N2. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 1288-1299, 2008.
<https://doi.org/10.1099/vir.0.83362-0>

XU, X. et al. Bovine herpesvirus type 1 induces apoptosis through Fas-dependent and mitochondria controlled manner in Madin-Darby bovine kidney cells. **Virol. Journal**, v. 9, p. 202-211, 2012.
<https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-202>

YOUNT, B. et. al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus group-specific open reading frames encode nonessential functions for replication in cell cultures and mice. **J. Virol.**, v. 79, n. 23, p. 14909-14922, 2005.
<https://doi.org/10.1128/JVI.79.23.14909-14922.2005>

ZHANG, Y. et al. Expression of the C-type lectins DC-SIGN or L-SIGN alters host cell susceptibility for the avian coronavirus, infectious bronchitis virus. **Vet. Microbiol.**, v. 157, p. 285–293, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.01.011>

ANEXO

Normas do periódico Brazilian Journal of Poultry Science - Capítulo 3



INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Scope and policy](#)
- [Preparing the manuscript](#)
- [Layout of the articles](#)

**ISSN 1516-635X printed
version**

**ISSN 1806-9061 online
version**

Scope and policy

The publication of the Brazilian Journal of Poultry Science is coordinated by the Publishing Committee of FACTA (APINCO Foundation of Poultry Science and Technology). All published research data and conclusions are of authors' full responsibility.

The Brazilian Journal of Poultry Science is published quarterly and the journal will consider for publication only original research material relevant to the field of poultry science. Considered subject areas will include: Immunology, Biochemistry and Cellular Biology, Housing and Environment, Wasting Control, Avian Diseases, Nutrition, Genetic Improvement, Physiology and Breeding, Management, Egg Production, Meat Technology, and Wild and Exotic Birds and Quail Production.

The journal's main objective is to publish complete scientific and technical papers as well as literature reviews in the area of poultry science written by researchers and poultry science specialists. Authors wishing to submit a review, guest editorial or technical review should contact the journal's editor.

All submitted manuscripts are evaluated in a blind peer-review, and in a total confidential and impartial way. Manuscripts should be submitted in the **English language only**.

Submission of a manuscript to the Brazilian Journal of Poultry Science implies that:

1. it has not been previously published;
2. it has not being submitted for publication elsewhere;
3. all authors have approved the submission;
4. all authors have obtained permission from their employer or institution to publish it, and
5. that relevant permissions, including ethical approval, has been obtained. Papers describing experiments which demonstrate a lack of concern of current ethical and welfare standards will not be considered for publication.

The manuscript and other correspondence should be sent preferentially by e-mail: <https://mc04.manuscriptcentral.com/rbca-scielo>

The Journal uses the software Grammarly/Plagiarism for identifying plagiarism.

The process of review of manuscripts adopted by the journal is blind peer review.

Preparing the manuscript

Full length article

It should contain the results of original research which contributes in a relevant way to the development of poultry science. If part of the results has been published previously as a summary or short paper in scientific events, it must be stated. Priority will be given to manuscript presenting new concepts, methodologies or innovative experimental approaches.

The manuscript should have the following sections:

Title
Abstract
Introduction
Material and Methods
Results
Discussion
References
Acknowledgements should be included after Discussion.

The sections Results and Discussion can be presented jointly if preferred. The Abstract should contain up to 250 (two hundred and fifty) words, followed by the key words in alphabetic order, limited to 5 (five) words which correspond to words or expressions that identify the contents of the article.

Short communications and Case Reports should have the same

layout as full length papers, including the headings (Introduction, Abstract, Material and Methods, Result, Discussion, Acknowledgments and References). They should be presented in a text with up to 1000 words (plus Abstract and References) and should contain no more than three tables and/or figures.

Technical article

Technical articles should present the development of new methodologies and/or techniques that can be applied to improve poultry production. These should follow the editorial norms including all sections of the scientific article.

Guest Editorial and Invited Review

Both Guest Editorial and Invited Review will be published by invitation only. The review should follow the norms of the scientific article without the sub-items of Material and Methods, Results and Discussion and preserving all others present in a full length manuscript.

Layout of the articles

1. Cover Page: all manuscripts should have a cover page with the title, complete name(s) of the author(s) and institution of origin. A footnote mentioning the complete address (e-mail is essential) of the author to whom correspondence should be addressed.

2. Tables: must be numbered consecutively with Arabic numerals in the text. Tables must have a descriptive title. All explanatory information should be given in a footnote below the table. All abbreviations must be defined in this footnote, even if they are explained in the text. Tables must be understandable without referring to the text.

3. Illustrations (photographs, graphs, drawings): must be numbered consecutively with Arabic numerals. All figures should be submitted on separate pages with the title of the article, name(s) of the author(s) and indication of the part of the text where they should appear.

Photographs, figures and scanned material must be sent in high resolution (minimum 600 dpi, .tif or .jpg format). The figures will be published in black and white. Previous expenses agreement is needed if the author wishes to publish color photos and or figures.

4. Units: the International Metric System must be used for units and abbreviations.

5. References: these should be arranged in alphabetic order by the author's last name. The complete title of the journal should be mentioned. All authors of the article must be cited.

Examples:

Bakst MR, Gupta K, Akuffo V. Comparative development of the turkey and chicken embryo from cleavage through hypoblast formation. *Poultry Science* 1997; 76(1):83-90.

Bouzoubaa K, Nagaraja KV. Epidemiological studies on the incidence of salmonellosis in chicken breeder/hatchery operations in Marocco. In: Snoeyenbos GH, editor. *Proceedings of the International Symposium on Salmonella*; 1984; Kenneth Square, PA: American Association Avian Pathologists; 1985. p.337.

Briceno WNO, Guimarães FCR, Cruz FGG. Efeitos da densidade populacional de frangos de corte em época quente no município de Manaus. In: 10o Congresso Brasileiro de Avicultura; 1987; Natal, Rio Grande do Norte. Brasil. p. 131-2.

Gabriel JE. Efeitos do nível energético da ração e do estresse térmico na expressão da proteína de choque térmico Hsp70 e nos níveis do seu mRNA no fígado de frangos de corte em diferentes estágios de desenvolvimento. [Dissertation]. Jaboticabal (SP): Universidade Estadual Paulista; 1996.

Ginsburg M. Primordial germ cell development in avians. *Poultry Science* 1997; 76(1):91-5.

Simon VA, Oliveira C. Vacinação em avicultura através da água de bebida. In: Macari M, editor. *Água na avicultura industrial*. Jaboticabal: Funep-Unesp; 1996. p. 73-85.

Summers JD, Leeson S. *Commercial poultry nutrition*. 2 ed. New York; N.Y / State Manual Book & Periodical Services; 1997.

6. Quotations in the text: state the last name of the author followed by the year in parenthesis. In the case of two authors both should be stated. In the case of more than two authors the quotation should be given by the last name of the first author followed by the expression *et al.* (in italic).

Examples:

Simon (1996)

Silva & Silva (1988)

Briceno *et al.* (1987)

7. Scientific names of microorganisms: must follow Berg's Manual recommendation.

8. Fees: The BJPS do not charge to submit the article, we only

charge if your article was approved to publication. The author(s) will be charged US\$ 400,00 (four hundred dollars) per edited article and the payment should be made previously the publication. No reprints will be supplied to authors as the articles are shown at www.scielo.br/rbca

9. Manuscript Proof: will be sent to the corresponding author, who should be identified on the cover page of the manuscript. Corrected proof should return within three days, preferable by fax. The Editor reserves the right to forward the manuscript to press without submitting the final proof to the author. The Editor shall not be hold responsible for any mistakes shown in the final publication.

10. Offprints: There is no free offprints. They can be provided after Editor consultation.

11. Copyright: it is a condition of publication that the authors issue copyright of their article to FACTA. Authors may use the article after the publication without prior permission from FACTA, provided that acknowledgement is given to the journal as its original source of publication. Authors are responsible for obtaining permission to reproduce in the text copyright material from other sources.

11. Submission: manuscript should be submitted via ScholarOne at: <https://mc04.manuscriptcentral.com/rbca-scielo>.

[[Home](#)] [[About the journal](#)] [[Editorial Board](#)] [[Subscription](#)]



All the contents of the journal, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons Attribution License](#)

**Av. Andrade Neves, 2501 - Castelo
13070-002 Campinas SP Brasil
Tel.: (55 19) 3243-6555
Fax.: (55 19) 3243-8542**



rvfacta@terra.com.br