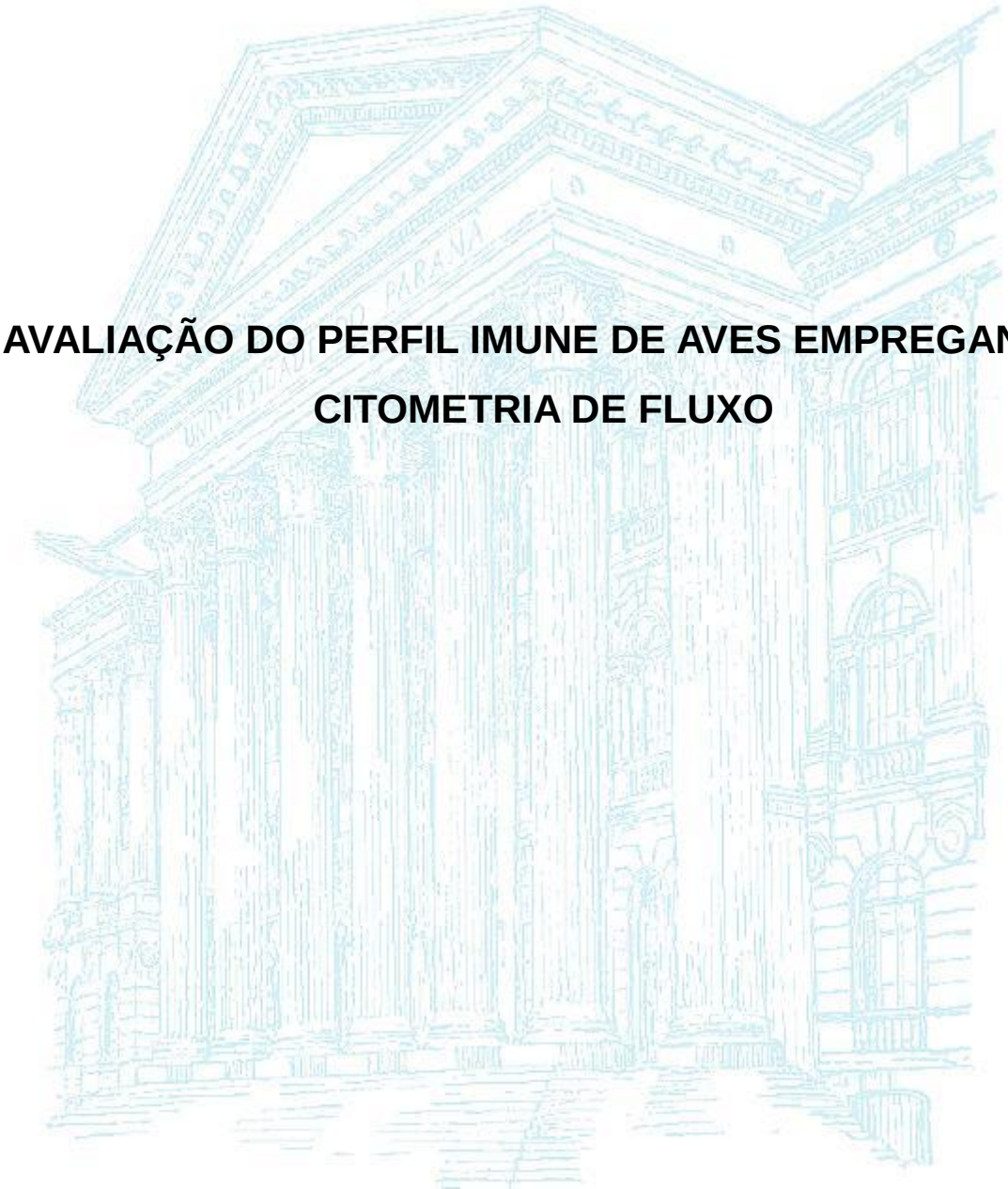
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRENO CASTELLO BRANCO BEIRÃO



AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNE DE AVES EMPREGANDO CITOMETRIA DE FLUXO

CURITIBA

2011

BRENO CASTELLO BRANCO BEIRÃO

AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNE DE AVES EMPREGANDO CITOMETRIA DE FLUXO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, área de concentração em Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora:

Prof.ª Dr.ª Adriana Frohlich Mercadante

Co-orientadores:

Prof. Dr. Luiz Felipe Caron

Prof. Dr. Sílvio Marques Zanata

CURITIBA

2011

Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETORES DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS e da SAÚDE
Departamentos de Patologia Básica e Patologia Médica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

"Avaliação do perfil imune de aves empregando citometria de fluxo"

por

BRENO CASTELLO BRANCO BEIRÃO

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:

Adriana F. Mercadante
Profª. Drª. Adriana F. Mercadante (presidente)

Profª. Drª Andrea Emilia Marques Stinghen

Drª. Rosângela Locatelli Dittrich

Dra. Elizabeth Cunha Penna de Moraes
Membro suplente

Curitiba, 28 de fevereiro de 2011.

AGRADECIMENTOS

Ao Pai, à Mãe, à Carla e ao Gustavo. Mais um passo dado com eles.

À Carolina. Foram muitos atrasos, longas horas de espera. O resultado da sua paciência é este trabalho.

Aos meus orientadores, professora Adriana, professor Luiz Felipe e professor Sílvio. Seria difícil formar outro time de orientadores capazes de ensinar tanto, sobre tantas coisas diferentes. Agradeço à liberdade para inventar! Na impossibilidade de descrever a longa contribuição individual de cada um na minha formação, fico com os pontos comuns que todos fizeram questão de passar adiante: a vontade de trabalhar e o caráter.

A todo o pessoal do laboratório. Saio com a certeza de que nesses dois anos fiz mais do que colegas. Agradeço-os todos: Rodrigo, Max, Sofia, Michele, Luiz, Bia, Mônica, Sílvia, Karime, Giuseppe, Beth, Chelin, Márcia, Alessandra, Axel, os alunos de IC. Agradeço ao Celso, companheiro direto da labuta dia sim e outro também, e à Evelyn, braço direito e esquerdo. Sem estes dois, teria sido rigorosamente impossível ter feito tudo o que foi feito e ainda mais um pouco, fora do *script*. Ao escrever essa lista dessa maneira, sinto estar cometendo várias injustiças. Muitos foram os que colaboraram demais para tudo o que está escrito nas páginas que se seguem: com piadas, bom (ou mau) humor, conversas, e, sim, trabalho.

Ao amigo Bruno Gavinho, por todo o papo jogado fora.

Aos velhos amigos de sempre.

Ao Dr. Juliano Bordignon e colegas do ICC/IBMP. Praticamente aprendi a “citometrar” com eles. A cooperação do Dr. Juliano foi fundamental durante praticamente todo o Mestrado. Espero poder retribuir sua compreensão e boa vontade para comigo nas excessivas horas de citômetro.

À Biovet e seus colaboradores, em especial às Dr[a]. Sandra Fernandez, Dr[a]. Jane Fraga e Dr[a] Alexandra Silva, por todo o trabalho envolvendo as aves SPF.

Aos participantes da cooperação com USP/Intervet, especialmente à Dr[a]. Laura Villarreal pelo trabalho envolvendo a infecção com IBV.

À CAPES e ao Programa de Microbiologia, Parasitologia e Patologia (e todos os envolvidos) pela bolsa e o suporte que me permitiram realizar este Mestrado.

RESUMO

A criação de aves para consumo ou para a produção de ovos passou por um longo processo de aperfeiçoamento para atingir os níveis atuais de produtividade, como melhoras na nutrição e melhoramento genético dos animais para os parâmetros zootécnicos. A intensa seleção de índices ligados à produtividade a que esses animais foram submetidos atingiu inversamente parâmetros associados com a capacidade metabólica (*fitness*) – como o sistema imunológico. O tênue balanço entre repouso/ativação imune e a capacidade produtiva tornam relevante avaliar como o sistema imune de aves de produção se comporta. Os objetivos deste trabalho foram estabelecer como os parâmetros imunes – medidos pela quantidade de células circulantes através de citometria de fluxo para determinados marcadores – comportam-se diante de diferentes situações, desde higiene controlada a desafios experimentais. A definição de parâmetros que sejam consistentemente ligados a alguma alteração, ou a uma situação específica de desafio, por exemplo, pode ser útil para que a metodologia possa servir como um método analítico para criações comerciais ou indústrias envolvidas na avicultura. Foi evidenciado que diversas subpopulações de linfócitos apresentam flutuações, em porcentagem de células circulantes, com o passar do tempo (como CD4 e CD8) – em geral as mudanças observadas indicam uma maturação imunológica. Contudo, as aves SPF demonstram um estado de menor uso e ativação imunitária do que aves mantidas em condições sanitárias comuns. A avaliação por citometria do sistema imune de aves submetidas a diferentes infecções indica que alguns parâmetros são consistentemente alterados sob os vários estímulos, e têm grande valor na compreensão da evolução da infecção. Entre esses parâmetros, destacam-se, por exemplo, as células $CD8^{+}CD28^{-}$ e as portadoras de TCRVβ1 e seus subgrupos ($CD4^{+}$ ou $CD8^{+}$). A importância da avaliação dos parâmetros imunes por citometria pôde ser exemplificado através da sua associação com a capacidade zootécnica de frangos de corte. Os parâmetros $CD4^{+}TCRV\beta1^{+}$ e CD4:CD8 em conjunção foram negativamente correlacionados com o ganho de peso dos animais. A resposta imune medida por citometria pode ser associada a uma ativação generalizada do sistema imune, conforme medido por outros parâmetros, como a atividade do sistema complemento.

Palavras-chave: Citometria de fluxo; sistema imune; frangos; avicultura

ABSTRACT

The raising of poultry for eating or egg production went through a long process of improvement to reach the current levels of productivity, such as advances in nutrition and genetic selection of birds for zootechnical parameters. The intense selection for production traits that these animals through which these animals went has affected inversely parameters linked to fitness – such as the immune system. The subtle balance between immune rest/activation and the production characteristics make it relevant to assess how the immune system of poultry behaves. The objectives of this work were to establish how do the immune parameters – measured by the count of circulating subsets of cells through flow cytometry – behave under different situations, from high hygiene to experimental challenges. It was verified that many subpopulations fluctuate with ageing (such as CD4 and CD8) – which indicates immunological maturation. However, SPF chicken show a state of lesser immune activation and usage, when compared to birds in regular hygiene settings. The evaluation of the immune system of birds submitted to various infections indicates that some parameters are consistently altered under differing stimulus, and have great value in the comprehension of the progression of the infection. Among these parameters, it can be highlighted the $CD8^+CD28^-$ and the TCRVβ1 bearing cells and its subgroups ($CD4^+$ or $CD8^+$). The importance of the evaluation of the immune parameters using flow cytometry could be exemplified through its association with the productivity traits of broilers. The $CD4^+TCRV\beta1^+$ and CD4:CD8 parameters, collectively, were negatively correlated to the birds` weight gain. The immune response as measured by cytometry was interconnected with generalized activation of the immune system, as measured using other parameters, such as the complement system.

Keywords: Flow cytometry; immune system; poultry; aviculture

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – AVALIAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA EM CITOMETRIA DE FLUXO. 19
Figura 2 – MÉTODO DE COLETA DE SANGUE. 33
Figura 3 – MEDIÇÃO DO TAMANHO DA BURSA DE FABRÍCIUS. 45
Figura 4 – COMPARAÇÃO ENTRE EDTA E ALSEVER. 50
Figura 5 – COMPARAÇÃO ENTRE EDTA E HEPARINA. 50
Figura 6 – TRANSPORTE DIFERENCIADO ENTRE AS AMOSTRAS. 52
Figura 7 – TESTE DOS ANTICORPOS. 53
Figura 8 – RESULTADOS DAS IDADES DE AVES SPF. 55
Figura 9 – POPULAÇÕES COM FLUORESCÊNCIA BRIGHT. 56
Figura 10 – RESULTADOS DE DESAFIOS EXPERIMENTAIS. 66
Figura 11 – (A) REGRESSÃO ENTRE AS SUBPOPULAÇÕES $CD4^{+}CD8\alpha^{+}$ E $CD8\alpha^{+}CD8\beta^{-}$ 67
Figura 12 – RESULTADOS INFECÇÃO POR IBV EM GALOS. 70
Figura 13 – EXEMPLO DE DUPLA MARCAÇÃO $CD8\alpha^{+}CD28^{-}$. 71
Figura 14 – RESULTADOS MARCAÇÃO DE CÉLULAS $CD8^{+}CD28^{-}$ (ATIVADAS) 71
Figura 15 – $GDP_{NORMALIZADO}$. 73
Figura 16 – GDP ABSOLUTO. 73
Figura 17 – DISTRIBUIÇÃO DO GDP. 74
Figura 18 – GDP E CA. 75
Figura 19 – CORRELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS IMUNES E GDP. 78
Figura 20 – QUANTIDADE DE LINFÓCITOS AO LONGO DAS 7 SEMANAS DE EXPERIMENTO. 81
Figura 21 – FLUTUAÇÃO DA RELAÇÃO HETERÓFILOS:LINFÓCITOS (H:L), POR SEMANA DO EXPERIMENTO. 81
Figura 22 – RELAÇÃO H:L COM GDP. 82
Figura 23 – AMOSTRAS REPRESENTATIVAS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA. 84
Figura 24 – ASSOCIAÇÃO ENTRE TCRVβ1 NO SANGUE E INTESTINO. 85
Figura 25 – MORFOLOGIA TECIDUAL 85
Figura 26 – TESTE DE HEMÓLISE E HEMAGLUTINAÇÃO FEITO COM PLASMA DE FRANGOS CONTRA ERITRÓCITOS HUMANOS. 86
Figura 27 – ASSOCIAÇÃO ENTRE GDP E HEMÓLISE. 87

Figura 28 – QUANTIFICAÇÃO DE IGY NO PLASMA DE GALINHAS POR WESTERN BLOTTING. 88
Figura 29 – REGRESSÃO DO TAMANHO DA BURSA DE FABRÍCIUS COM A PORCENTAGEM DE LINFÓCITOS B CIRCULANTES. 89
Figura 30 – ASSOCIAÇÃO ENTRE $CD8\alpha^{+}CD28^{-}$ E TCR. 90
Figura 31 – ASSOCIAÇÃO ENTRE $TCRV\beta1^{+}$CD4 OU CD8 COM $CD8\alpha\alpha$. 90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - ESPECIFICIDADE ANTIGÊNICA DE CADA ANTICORPO.....36
Tabela 2 – AGENTE INFECCIOSO UTILIZADO E MODO DE INFECÇÃO. 40
Tabela 3 – PORCENTAGENS DE LINFÓCITOS NO SANGUE PERIFÉRICO DE GALINHAS SPF DE DIFERENTES IDADES. 58
Tabela 4 – LEUCOGRAMA DE AVES SPF, EM TRÊS FAIXAS ETÁRIAS. 59
Tabela 5 – COMPARAÇÃO ENTRE AVES COMUNS E AVES MANTIDAS SOB CONDIÇÕES SPF. 60
Tabela 6 – COMPARAÇÃO ENTRE AVES MANTIDAS SOB CONDIÇÕES SPF SOB DIFERENTES DESAFIOS, PORCENTAGENS DE CÉLULAS CIRCULANTES. 63
Tabela 7 – LEUCOGRAMA DE AVES SPF INFECTADAS POR DIFERENTES AGENTES. 64
Tabela 8 – COMPARAÇÃO ENTRE AVES MANTIDAS SOB CONDIÇÕES SPF E SUBMETIDAS A DIFERENTES DESAFIOS, EM VALORES ABSOLUTOS DE CÉLULAS CIRCULANTES (CÉLULAS/MICROLITRO DE SANGUE).....65
Tabela 9 – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA POR CITOMETRIA DE FLUXO DE GALOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA AVIÁRIA (IBV).....135
Tabela 10 – AVALIAÇÃO DE RISCO DE BAIXO GDP.....80
Tabela 11 – QUANTIFICAÇÃO DE IGY. 88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC – Célula apresentadora de antígenos (*antigen presenting cell*)

BI – Bronquite infecciosa

BSA – Albumina sérica bovina (*bovine serum albumin*)

Bu1 – antígeno expresso na superfície de linfócitos B

CA – Conversão alimentar

CD – *Cluster of differentiation*

DIE – Dose infectante em embrião

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (*ethylenediamine tetra acetic acid*)

FITC – Fluoresceína isotiocianato

FSC – Dispersão frontal (*forward scatter*)

GDP – Ganho de Peso Diário

GDP_{norm} – Ganho de peso diário normalizado pela média de peso da semana

H:L – Relação entre heterófilos e linfócitos

HIV – Vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

IBDV – Vírus da doença da Bursa ou de Gumboro (*Infectious Bursal Disease Virus*)

IBV – Vírus da bronquite infecciosa (*Infectious Bronchitis Virus*)

IC – Intervalo de confiança

KUL01 – Marcador que reconhece células do sistema fagocítico mononuclear de galinhas (monócitos, macrófagos e células interdigitadas)

Mass – Cepa Massachussets do IBV

Mr – Massa molecular relativa

Nac – Anticorpo natural

NGS – Soro normal de cabra (*Normal goat serum*)

NK – *Natural killer*

OCT – *Optimal cutting temperature*

PBS – Phosphate buffered saline

PE – Ficoeritrina

pi – Pós-infecção

RA – Risco atribuível

RR – Risco relativo

SD – Desvio padrão (*standard deviation*)

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SE – *Salmonella enteritidis*

SNP – Polimorfismo em um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism*)

SPF – Aves Livres de Patógenos Específicos (*Specific Pathogen Free*)

SSC – Dispersão lateral (*side scatter*)

TBST – *Tris buffered saline tween* 20

TCR – Receptor de linfócitos T (*T cell receptor*)

UA – Unidades arbitrárias

ZEA – Zearalenona

SUMÁRIO

RESUMO 4
ABSTRACT 7
LISTA DE FIGURAS 8
LISTA DE TABELAS 10
1 INTRODUÇÃO 16
1.1 CITOMETRIA DE FLUXO 18
1.2 MARCADORES MOLECULARES USADOS NA ANÁLISE DOS PARÂMETROS IMUNITÁRIOS 20
1.3 SISTEMA IMUNE AVIÁRIO 21
1.4 CARACTERIZAÇÃO DA VALIDADE DOS PARÂMETROS CITOMÉTRICOS SOB SITUAÇÕES VARIADAS 23
1.4.1 Aves SPF 23
1.4.2 Infecções 23
1.4.3 Imunossenescência e Fenótipo Imunológico de Risco 29
2 OBJETIVOS 30
2.1 OBJETIVOS GERAIS 30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 30
3 MATERIAL E MÉTODOS 32
3.1 AVES 32
3.2 SANGUE HUMANO 32
3.3 COLETA DE SANGUE 32
3.4 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES E MARCAÇÃO PARA ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO 34
3.5 ANTICORPOS 35
3.6 CITOMETRIA DE FLUXO 35
3.7 EXPERIMENTOS 37
3.7.1 Padronização da técnica 37
3.7.2 Aves Livres de Patógenos Específicos 38
3.7.3 Comparação de aves comuns de diferentes linhagens versus aves SPF 39
3.7.4 Aves em condição SPF sob desafio de infecção experimental 39
3.7.5 Experimento Bronquite Infecciosa das Galinhas 41

3.7.6 Efeitos dos parâmetros imunes sobre a produtividade e mecanismos de ação destes parâmetros 41
3.7.6.1 Medidas das bursas de Fabrícius 44
3.7.6.2 Teste de hemólise e hemaglutinação e quantificação de IgY total plasmática 45
3.7.6.3 Imunofluorescência de secções de tecido 46
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA 48
4 RESULTADOS 49
4.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA 49
4.1.1 Padronização para definir o anticoagulante a ser utilizado – EDTA e heparina são similares para citometria de fluxo 49
4.1.2 Teste de temperatura e modo de envio das amostras 51
4.1.3. Padronização dos demais anticorpos 52
4.2 AVES LIVRES DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS (*SPECIFIC PATHOGEN FREE* – SPF) E OS PARÂMETROS CITOMÉTRICOS DE IMUNIDADE AO LONGO DE SEU DESENVOLVIMENTO 53
4.3 AVES COMUNS VS. AVES SPF 59
4.4 AVES EM CONDIÇÃO SPF SOB DESAFIO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL 60
4.5 DESAFIO BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS – PARCERIA UFPR/USP/INTERVET 67
4.6 EFEITOS DOS PARÂMETROS IMUNES SOBRE A PRODUTIVIDADE E MECANISMOS DE AÇÃO DESTES PARÂMETROS 72
5 DISCUSSÃO 91
5.1 DIFERENÇAS ENTRE IDADES DE AVES SPF, E COMPARAÇÃO COM AVES MANTIDAS EM CONDIÇÕES NORMAIS 92
5.2 INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE AVES SPF POR QUATRO AGENTES INFECCIOSOS E DE GALOS POR IBV 99
5.3 PARÂMETROS CITOMÉTRICOS, SEU EFEITO SOBRE A PRODUTIVIDADE E MECANISMOS DE AÇÃO DO SISTEMA IMUNE SOBRE A CAPACIDADE PRODUTIVA 105
5.3.1 Proporção CD4:CD8 e $CD4^{+}TCRV\beta1^{+}$ em relação ao ganho de peso – O fenótipo imune de risco para baixo GDP 106
5.3.2 Relação Heterófilos:Linfócitos (H:L) e GDP 109
5.3.3 Capacidade Hemolítica e Hemaglutinante e quantidade plasmática de IgY 110
5.3.4 Tamanho da Bursa 111

5.4 CONSIDERAÇÕES ESPECIAIS SOBRE ALGUNS PARÂMETROS CITOMÉTRICOS....112
5.4.1 $CD8^{+}CD28^{-}$ e CD4:CD8 nas situações de infecção experimental e perfil de risco imune....112
5.4.2 CD8αα, $CD4^{+}CD8^{+}$, $CD28^{-}$ e TCRVβ1....114
6 CONCLUSÕES....116
7 BIBLIOGRAFIA....118
ANEXO 1 – ANÁLISE DE MICOTOXINAS NA RAÇÃO....131
ANEXO 2 – LEUCOGRAMA....132
ANEXO 3 – TABELA BRIDLE ET AL., 2006....133
ANEXO 4 – VALORES OBTIDOS EM INFECÇÃO POR IBV....134

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de frangos do mundo, e a região Sul tem posição destacada dentro do País. O Paraná é o estado brasileiro com maior produção de carne de frangos, sendo responsável por 25% da produção nacional. Santa Catarina é o segundo maior produtor, respondendo por cerca de 19% de toda a carne de frango do País e o Rio Grande do Sul é o 4º colocado nesse setor. Os três estados produzem, em conjunto, cerca de 58% da carne de frango brasileira. Desde 1970, a produção brasileira cresceu 187%, e enquanto o consumo *per capita* aumentou 3,8 vezes desde 1986 para a carne de frango, cresceu apenas 1,9 vezes para a carne suína e 1,25 vezes para a carne bovina. A partir de 2006, o consumo total de carne de frango *per capita* superou a carne bovina, e atualmente um brasileiro consome em média mais aquela carne do que esta. A partir de 1986, o consumo de ovos por ano por indivíduo passou de 94 para 120. Além do consumo interno, a carne de frango é a carne mais exportada pelo Brasil (U.B.A., 2009).

Entre 85 e 90% do aumento do ganho de peso verificado na produção de frangos nos últimos anos resultou da seleção genética aplicada sobre esses animais (HAVENSTEIN *et al.*, 1994). A seleção genética para produtividade pode resultar em alterações sobre outras características. Há duas causas de correlação genética entre duas características: ligação (*linkage*) entre os genes de ambas as características e pleiotropia, quando um único gene afeta duas ou mais características. Para galinhas, os genes que afetam o crescimento são separados dos genes associados à capacidade imune (SIWEK *et al.*, 2004). Entre muitas características opostas ligadas, ocorre o que se denomina de *trade-off*, em que o aumento da expressão fenotípica de uma característica se dá em detrimento da outra. Para o aumento do ganho de peso, há perda de características que são custosas metabolicamente (SCHUTZ *et al.*, 2002). Na criação de aves ou de suínos, é altamente desejável uma alta capacidade de ganho de peso (GDP) com o menor consumo alimentar possível, poupando recursos investidos pelo produtor na alimentação. Contudo, quando se selecionam animais para alta produtividade com baixo consumo de alimentos, a energia alocada para as características de manutenção são diminuídas. A consequência observada seria uma maior suscetibilidade do animal ao ambiente. Apenas não restringir a alimentação não é

suficiente para corrigir o desvio de energia das necessidades metabólicas para o aumento de produtividade (VAN DER WAAIJ, 2004).

Polimorfismo em um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism* – SNP) de genes associados a proteínas do sistema imune como interleucina-2 (IL-2) e interferon γ (IFNγ) são encontrados em aves de alta capacidade produtiva, e estão associados com maior mortalidade, o que indicaria um efeito pleiotrópico desses genes. A expressão desses SNP pode variar em ambientes de alta ou baixa higiene, significando diferenças entre as interações da função imunológica com caracteres produtivos, por exemplo. Isso indica a complexidade da interação entre fatores genéticos e ambientais. As aves realocam mais recursos para as características para as quais foram selecionadas inicialmente. Quando aves são movidas de condições ótimas para sub-ótimas, tendem a realocar recursos para adaptarem-se ao novo ambiente, como estimular a competência imune, e por isso variações genotípicas ocorrem em diferentes ambientes, sendo refletidas em alterações fenotípicas (RAUW *et al.*, 2003; VAN DER WAAIJ, 2004; YE *et al.*, 2006).

Pouco se conhece sobre o estado imunológico de aves de produção, aparentemente saudáveis, e que são constantemente imunizadas e passam por intensos processos de seleção de características interessantes do ponto de vista zootécnico (BRIDLE *et al.*, 2006). As populações de linfócitos do sangue periférico parecem ser bons marcadores para avaliar a imunocompetência desses animais. Sabe-se, por exemplo, que a proporção CD4:CD8 é muito mais reduzida em aves criadas comercialmente, parâmetro que indica menor imunocompetência, como aumento na suscetibilidade a doenças (EWALD *et al.*, 1996; BRIDLE *et al.*, 2006). A seleção tímica de subgrupos de células linfocitárias também possui caráter genético, sendo dependentes do controle e da expressão do complexo B (EWALD *et al.*, 1996), o que evidencia a importância da seleção genética na imunidade. Em situações de desafio, as subpopulações de linfócitos circulantes ajudam a compreender a patogenia e evolução das infecções, e como controlá-las. Vacinas altamente protetoras contra a doença de Marek (doença tumoral causada por herpesvírus em aves) induzem aumento na quantidade periférica de células T auxiliares, citotóxicas, duplo-positivas ($CD4^+CD8^+$), de células positivas para MHC I e MHC II (GIMENO *et al.*, 2004). Aumento nas porcentagens circulantes de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ já foram associados à proteção contra a Bronquite Infecciosa das Galinhas (YANG *et al.*, 2009).

Assim, por exemplo, a subpopulação de linfócitos T citotóxicos no baço de galinhas é maior em aves criadas em granjas avícolas do que aves que cresceram em laboratório (ERF *et al.*, 1998), bem como em aves estimuladas por antígenos (PARMENTIER *et al.*, 1995).

A avaliação imune de aves criadas comercialmente é necessária para proteger contra doenças associadas com manejo intenso e para garantir a aplicação segura de agentes terapêuticos ou imunização profilática (DIETERT *et al.*, 1994). A avaliação atualmente feita sobre o sistema imune em situações comerciais, como sorologia e aferição do tamanho de órgãos linfoides podem não ser tão sensíveis quanto desejado, ou tampouco ter a capacidade de elucidar a mecânica da alteração observada (HECKERT *et al.*, 2002; BOLIS *et al.*, 2003; MENDONÇA *et al.*, 2009). A avaliação feita pela maior parte dos estudos voltados à imunofenotipagem de linfócitos aviários se foca em amostras do baço e timo, havendo, recentemente, alguns poucos estudos sobre as populações celulares circulantes, de mais fácil avaliação (RUSSELL *et al.*, 1997; BRIDLE *et al.*, 2006; FAIR *et al.*, 2008).

Como será visto, o presente trabalho procurou estabelecer parâmetros imunitários de linfócitos circulantes de aves pela técnica de citometria de fluxo importantes para várias situações (de higidez ou desafio). A citometria de fluxo é uma técnica altamente sensível e que tem sido utilizada por alguns grupos para a imunofenotipagem de células de aves (BRIDLE *et al.*, 2006; FAIR *et al.*, 2008). A seguir será feita uma breve revisão sobre a técnica de citometria de fluxo.

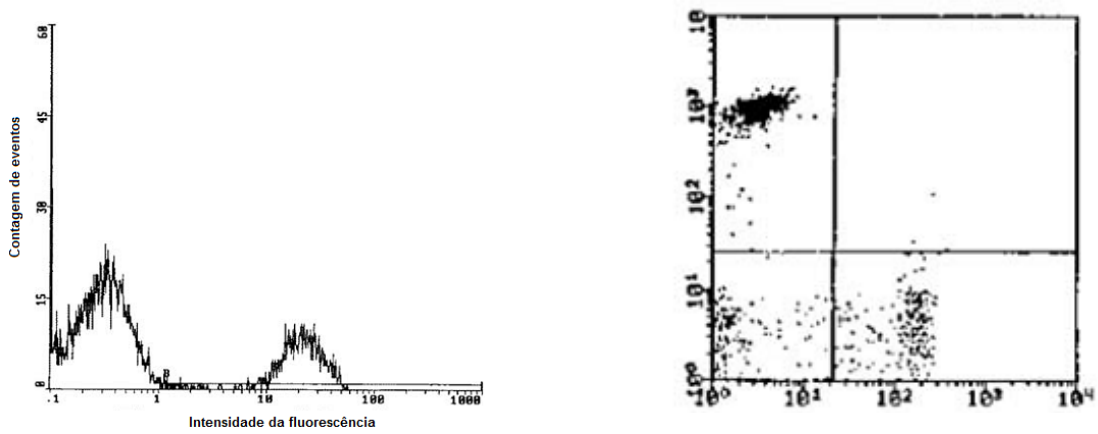
1.1 CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é uma técnica que permite analisar o fenótipo celular. A tecnologia vem sendo desenvolvida desde os meados da década de cinqüenta, e a partir da década de 90 iniciaram-se os estudos utilizando marcação de moléculas que se desejava estudar por anticorpos fluorescentes ativados por laser. Os citômetros de fluxo atuais são capazes de ler ao menos os parâmetros de tamanho e granulosidade celular e alguns comprimentos de onda de fluorescência (MACEY, 2007).

O citômetro avalia cada célula individualmente, gravando vários parâmetros sobre a mesma célula. Assim, é permitido identificar uma população homogênea dentro de uma população maior heterogênea, ao contrário de espectrofluorímetros,

que avaliam a população como um todo. A estrutura básica de um citômetro consiste em uma ou mais fontes de laser e um sistema de captação da luz, um sistema hidráulico que controla a passagem de células pelo sistema de luz e um computador que coleta os dados e interpreta os sinais elétricos emitidos pelo sistema de luz (MACEY, 2007).

A fluorescência é excitada enquanto atravessa o raio de laser e é coletada pelo sistema óptico. Os fótons de luz que incidem sobre os detectores são convertidos pelos tubos de fotomultiplicação para um impulso elétrico o qual passa por um conversor analógico-para-digital, que é recebido pelo computador. A quantidade e intensidade de fluorescência são gravadas pelo computador e demonstradas pela freqüência de distribuição, que pode ser de um único parâmetro (FIGURA 1A), dois (FIGURA 1B) ou mais. Assim, células com maior ou menor fluorescência dentro de uma população podem ser diferenciadas (MACEY, 2007).



(A) (B)

FIGURA 1 – AVALIAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA EM CITOMETRIA DE FLUXO.
(A) UM PARÂMETRO AVALIADO. (B) DOIS PARÂMETROS AVALIADOS (MACEY, 2007).

O uso clínico da citometria foi disseminado à medida que se verificava o aparecimento e espalhamento do vírus da imunodeficiência humana (HIV) pelo mundo. O desenvolvimento da fase clínica em pacientes positivos para o HIV se dá com uma redução na quantidade de células $CD4^{+}$, o que leva a uma deterioração do sistema imune. A monitoria da quantidade dessas células em pacientes infectados tornou-se importante para o controle da progressão da doença e da resposta à terapia antirretroviral, e a citometria de fluxo é a técnica de eleição para essa avaliação (Revisado por (BARNETT *et al.*, 2008).

O uso de citometria de fluxo para avaliar as subpopulações de linfócitos de aves é tido como altamente sensível, e os anticorpos disponíveis comercialmente são bastante específicos; a precisão da avaliação da imunocompetência é superior a outros métodos (BRIDLE *et al.*, 2006; FAIR *et al.*, 2008). A fenotipagem das subpopulações de células mononucleares no sangue é feita através de uma identificação das células usando-se anticorpos ligados a fluorocromos como sondas de proteínas expressas pelas células. Linfócitos expressam diferentes arranjos de moléculas em sua superfície, muitas das quais refletem diferentes estágios em suas diferenciações linhagem-específicas ou diferentes estados de ativação-inativação. Ao utilizar combinações de diferentes anticorpos é possível discriminar as populações de diferentes leucócitos, cada qual com diferentes funções no sistema imune (FAIR *et al.*, 2008). Serão agora apresentadas algumas moléculas que podem ser utilizadas como marcadores celulares e que foram usadas no presente trabalho.

1.2 MARCADORES MOLECULARES USADOS NA ANÁLISE DOS PARÂMETROS IMUNITÁRIOS

As moléculas CD (*cluster of differentiation*) são usadas para identificar tipo celular, estágio de diferenciação e atividade de uma célula. As moléculas CD4 e CD8 marcam dois subtipos diferentes de linfócitos T, respectivamente linfócitos T auxiliares e regulatórios e linfócitos T citotóxicos e natural killer (NK). A competência imune correlacionada com um número maior de células T CD4 provavelmente representa uma resistência relacionada a patógenos extracelulares e a respostas dependentes de anticorpos, enquanto que as células CD8 positivas podem ter significado em infecções intracelulares e virais, que requerem uma resposta imune mediada por células (ZEKARIAS *et al.*, 2002; FAIR *et al.*, 2008). As populações de linfócitos CD8 são ainda subdivididas pelas diferentes expressões das cadeias α ou β de CD8, que variam em diferentes órgãos (TREGASKES *et al.*, 1995). Além disso, os linfócitos T de aves podem ser divididos em três subpopulações baseando-se na expressão de três diferentes tipos de receptores de linfócitos T (TCR), que são os TCR1 (ou TCRγδ), TCR2 (ou αβ Vβ1) e TCR3 (ou αβ Vβ2) (LAHTI *et al.*, 1991). O TCR é a molécula reconhecedora de antígenos dos linfócitos T, que se liga ao MHC (complexo principal de histocompatibilidade – *major histocompatibility complex*) com o antígeno apresentado por células apresentadoras de antígeno ou células

infectadas. As células do tipo αβ são o maior grupo de células efetoras em galinhas. Os co-receptores CD4 ou CD8 auxiliam o TRC no reconhecimento e ligação às moléculas de MHC contendo peptídeos (SHARMA, 1990).

O complexo principal de histocompatibilidade, ou complexo B, em galinhas, codifica glicoproteínas de membrana essenciais para a demonstração de antígenos para os linfócitos. As moléculas de classe I estão presentes em todos os tipos celulares e são responsáveis por apresentar peptídeos endógenos, incluindo peptídeos virais. Moléculas de MHC II são expressas por células apresentadoras de antígenos e demonstram peptídeos exógenos processados, como antígenos de bactérias (não as parasitas intracelulares) (ZEKARIAS *et al.*, 2002).

A molécula CD28 é estimulada durante o contato de linfócitos T com células apresentadoras de antígenos, sendo que o contra-receptor para essa molécula é B7, expressa em células apresentadoras profissionais de antígenos e linfócitos B ativados, por exemplo. A resposta de linfócitos T necessita da ativação de CD28, bem como a resposta de células B dependentes de linfócitos T (LINSLEY e LEDBETTER, 1993).

Bu1 é um antígeno expresso na superfície de linfócitos B e cerca de 95% das células da bursa de Fabrícius, mas não está presente nos plasmócitos (GILMOUR *et al.*, 1976).

O marcador KUL01 reconhece células do sistema fagocítico mononuclear de galinhas (monócitos, macrófagos e células interdigitadas). A sua expressão é adquirida no timo, até o dia embrionário 11, juntamente com a expressão de MHC II (MAST *et al.*, 1998).

1.3 SISTEMA IMUNE AVIÁRIO

Aves não possuem linfonodos encapsulados como os encontrados em mamíferos, e, ao invés disso, desenvolvem tecidos linfoides dispersos em quaisquer locais em que são antigenicamente estimulados no corpo. Assim, galinhas possuem grandes quantidades de agregados linfoides associados a mucosas. Ao longo do trato digestório, há diversos tecidos linfoides, como as tonsilas cecais (localizadas na ponta proximal das bolsas cecais), as placas de Peyer (cerca de seis estruturas linfoides difusas ao longo do intestino), a bursa de Fabrícius, divertículo de Meckel (um apêndice do intestino delgado remanescente do saco da gema), tonsilas pilórica

e esofagiana (localizada na junção entre esôfago e proventrículo), e outras estruturas linfoides menos definidas. Durante as fases embrionária e pós-natal os tecidos mais organizados são desenvolvidos, mas a maturação subseqüente dos tecidos linfoides é dependente de estímulo antigênico (UMESAKI *et al.*, 1993; OLÁH e VERVELDE, 2008).

A glândula harderiana é o maior tecido linfoide associado ao olho de aves, localizada na órbita atrás dos olhos. Tem infiltrados de linfócitos B e principalmente $CD4^+$ e $TCRV\beta1^+$ (OLÁH e VERVELDE, 2008).

A bursa de Fabrícius é o órgão linfoide de aves responsável pela maturação de linfócitos B (MUELLER *et al.*, 1962; MCCORMACK *et al.*, 1989). Nos órgãos linfoides primários, nominalmente timo e bursa, células tronco hematopoiéticas juntam-se à massa celular embrionária desses órgãos e desenvolvem-se para fazer a linfopoiese de células T e B, respectivamente. Ao final do período embrionário e durante a vida da ave, os progenitores linfoides que colonizam o timo e a bursa originam-se da medula óssea (OLÁH e VERVELDE, 2008).

Galinhas apresentam grandes quantidades circulantes de linfócitos relativamente a outras células leucocitárias, quando comparadas a outros animais. Em grande parte dos mamíferos e mesmo em outras aves, encontram-se mais neutrófilos/heterófilos circulantes do que linfócitos. Em galinhas essa proporção é invertida, e a relação entre heterófilos e linfócitos é quase sempre inferior a 1 (TALEBI *et al.*, 2005; FELDMAN *et al.*, 2006).

Apenas três imunoglobulinas (Ig) estão presentes em aves, identificadas como os homólogos das IgA, IgM e IgG de mamíferos. IgM é estruturalmente e funcionalmente similar ao equivalente mamífero. Virtualmente todas as células da bursa e linfócitos B expressam essa Ig em suas membranas. IgY é o equivalente aviário à IgG. É estruturalmente diferente desta, e é, na verdade, eqüidistante em termos evolucionários entre IgG e IgE, mas possui homologia na função com IgG. Apenas cerca de 1,6% dos linfócitos sanguíneos são IgY^+. IgA é a principal forma de anticorpo nas secreções corporais e mucosas (SHARMA, 1990; OLÁH e VERVELDE, 2008).

1.4 CARACTERIZAÇÃO DA VALIDADE DOS PARÂMETROS CITOMÉTRICOS SOB SITUAÇÕES VARIADAS

O presente trabalho avaliou diversos parâmetros imunitários através da citometria de fluxo, com aves mantidas sob diferentes condições - como SPF, aves mantidas em condições comuns, desafios experimentais. Os experimentos também serviram diferentes propósitos, como entender a interferência do sistema imune sobre a produtividade. A seguir serão introduzidas algumas informações sobre essas situações, as quais serão úteis para o entendimento da dissertação em questão.

1.4.1 Aves SPF

Aves Livres de Patógenos Específicos (*Specific Pathogen Free* – SPF) são animais mantidos em condições altamente controladas, em ambientes com sistemas de ar filtrado, pressão positiva e altos níveis de biossegurança. Para aves serem consideradas SPF, devem ser garantidamente livres de pelo menos 19 e até 32 dos principais agentes infecciosos que afetam esses animais (o nível mais alto, livre de 32 patógenos, está no nível considerado *para pesquisa*) (BRASIL, 2006). Por isso, estudar o sistema imune desses animais apresenta a vantagem de não possuir o viés da vacinação ou de desafios ambientais (BRIDLE *et al.*, 2006). A imunização parece elevar a quantidade total de linfócitos T circulantes e a imunidade mediada por células, por exemplo (TIMMS e ALEXANDER, 1977).

A comparação entre aves de idades diferentes pode representar um outro viés, e conhecê-lo pode auxiliar na interpretação de dados no futuro. Aves de idades maiores parecem reduzir a população linfocitária total, com uma menor proporção CD4:CD8, por exemplo (PARMENTIER *et al.*, 1995). Outros estudos, entretanto, sugerem que as aves possuem um sistema imune, de modo geral, mais competente na vida adulta (ERF *et al.*, 1998; KANEKO *et al.*, 2004; BRIDLE *et al.*, 2006).

1.4.2 Infecções

A citometria de fluxo tem sido extensivamente utilizada em pesquisas para avaliar a situação do sistema imune, o efeito de dados patógenos sobre a imunidade, além da capacidade de resposta dos animais aos estímulos. Como

exemplos, a dinâmica das subpopulações de linfócitos demonstra-se alterada em aves alimentadas com diferentes doses de micotoxinas (SWAMY *et al.*, 2004; CHOWDHURY *et al.*, 2005a; KAMALAVENKATESH *et al.*, 2005); apresentam-se diferentes proporções de subpopulações entre linhagens de aves comerciais (PARMENTIER *et al.*, 1995; ERF *et al.*, 1998; NESTOR *et al.*, 2001); alteram a resposta de hospedeiros aves contra enxertos (TSUJI *et al.*, 1996); parecem ter reduzida a expressão de MHC (Complexo B) de Classe I em aves infectadas pelo vírus de Marek – cuja resposta parece ser dependente da relação de MHC I com células NK (KAUFMAN *et al.*, 1999; HUNT *et al.*, 2001), mesmo que a proteína viral pp38 não seja encontrada em sangue periférico (SCHAT *et al.*, 1991). Entretanto, há relatos que em respostas contra antígenos específicos pode haver alteração dos leucócitos apenas nos órgãos linfocitários ou nas suas funções, não sendo evidenciadas alterações nos números de leucócitos circulantes (PARMENTIER *et al.*, 1995; CHOWDHURY *et al.*, 2005a; KAMALAVENKATESH *et al.*, 2005); somente a proporção (e não o número total) de células CD4 e linfócitos B pode estar aumentada no sangue desses animais (PARMENTIER *et al.*, 1995).

1.4.2.1 Coccidiose (*Eimeria spp.*)

A coccidiose aviária é causada por protozoários do gênero *Eimeria* que parasitam as células do epitélio intestinal de galinhas. Pertencem ao filo Apicomplexa. Seu ciclo de vida é composto por diversas formas do parasito. A infecção se dá pela ingestão de oocistos contendo esporozoítos. Estes são liberados pela ação mecânica da moela, e depois pela temperatura corporal, de enzimas pancreáticas e de sais biliares. Então livres na luz intestinal, os esporozoítos invadem enterócitos, células da lâmina própria ou criptas epiteliais. Linfócitos intraepiteliais transportam os esporozoítos das criptas para a lâmina própria. Dentro das células, os esporozoítos transformam-se em trofozoítos, arredondados. Os trofozoítos passam por uma série de divisões (merogonia ou esquizogonia), que faz com que essas células arredondadas individualize-se em uma células alongada, o merozoíto, que deixam a célula hospedeira para invadir novas células. Os merozoítos da geração final da esquizogonia penetram em novas células hospedeiras para iniciar uma fase sexuada do ciclo. Para tal, diferenciam-se em gamontes masculinos (microgamontes) e gamontes femininos (macrogamontes).

Microgamontes são merozoítos que sofrem várias divisões celulares originando muitos microgametas flagelados. Macrogametas são merozoítos que crescem em tamanho, com proliferação de organelas, incluindo as necessárias para a formação da parede do oocisto posteriormente. O macrogameta é fertilizado pelo microgameta para formar um zigoto e a parede do oocisto. O oocisto é liberado na luz do intestino e eliminado juntamente com as fezes, ainda imaturos. No meio exterior os oocistos formam os esporozoítos por um processo de esporogonia, passo necessário para a infectividade do oocisto (Revisado por KAWAZOE, 1994).

Existem sete espécies de eimeria parasitas de galinhas, que apresentam diferentes graus de patogenicidade, do local que infectam (porção intestinal afetada), de qual estágio está associado à patogenicidade e de imunogenicidade. São elas: *E. acervulina, E. brunetti, E. maxima, E.mitis, E.necatrix, E. tenella* e *E. praecox* (Revisado por KAWAZOE, 1994).

Após uma infecção por coccídeos, são ativadas tanto as respostas imunes por anticorpos como as mediadas por células. Vários fatores influenciam a capacidade dos esporozoítos em invadir as células epiteliais, incluindo se o hospedeiro já foi ou não exposto ao parasita e se desenvolveu imunidade. A capacidade de anticorpos em bloquear a entrada de esporozoítos é discutível. Algumas eimerias não se desenvolvem no local de invasão, e algumas espécies (como *E. acervulina* e *E. tenella*) são transportadas do local inicial para o local do seu desenvolvimento por células do hospedeiro, provavelmente linfócitos T CD8 intestinais (CHOI *et al.*, 1999a; LILLEHOJ, 1999). A depleção de linfócitos $CD4^+$, $CD8^+$, duplo-positivos ($CD4^+CD8^+$) ou $TCR\alpha\beta^+$ resulta no aumento significativo na produção de oocistos (BREED *et al.*, 1997). Uma variação na quantidade de linfócitos de um subtipo no intestino durante a infecção ocorre concomitantemente com uma variação oposta desse subtipo no sangue, permitindo uma fácil detecção por citometria de fluxo (BESSAY *et al.*, 1996).

1.4.2.2 Salmonelose (*Salmonella enteritidis*)

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*. São bastonetes gram-negativos, não esporogênicos, não encapsulados, anaeróbios facultativos, e o sorovar *enteritidis* é móvel. Existe marcada variação antigênica nas Salmonelas

infectantes para aves. *S. enteritidis* faz parte do grupo D_1 (NASCIMENTO e SANTOS, 2005).

As salmoneloses aviárias causadas por *Salmonella enteritidis* pertencem ao grupo que se convencionou chamar de paratíficas. Estas causam as doenças agudas ou crônicas não-específicas a uma espécie (no caso das aves, outras que não *S. gallinarum* ou *S. pullorum*). Assim, são patógenos de todas as espécies de mamíferos domésticos e de répteis, podendo, todavia, infectá-los cronicamente, fazendo-os portadores assintomáticos, que eliminam a bactéria nas fezes. Roedores são também portadores do agente, e, em conjunto com moscas, besouros, etc., que são vetores da bactéria, podem causar infecções em lotes sucessivos de aves. Podem sobreviver e multiplicar-se com facilidade no ambiente (NASCIMENTO e SANTOS, 2005).

A doença afeta principalmente aves jovens (até duas semanas de idade), enquanto que aves com mais de algumas semanas de vida tornam-se em geral portadoras intestinais assintomáticas. Após a ingestão da bactéria, o micro-organismo pode penetrar no epitélio intestinal e localizar-se na lâmina própria do epitélio (BERNDT *et al.*, 2006).

A transmissão transovariana da bactéria é incomum, mas pode ocorrer principalmente com *S. typhimurium* infectando os ovos. Cerca de 5% dos ovos coloniais no Brasil estão contaminados por Salmonelas (FLÔRES *et al.*, 2003). *S. enteritidis* e *S. typhimurium* são os dois sorovares mais frequentemente associados à salmonelose humana. Um caso de salmonelose em humanos pode causar diarréia, dor abdominal, náuseas, vômito, febre e dor de cabeça, podendo causar septicemia (FLÔRES *et al.*, 2003; NASCIMENTO e SANTOS, 2005).

A imunidade contra Salmonelas envolve o deslocamento de células $CD4^+$ e $CD8^+$ para o local da infecção (VAN IMMERSEEL *et al.*, 2002; BARUA e YOSHIMURA, 2004) e consequente redução na quantidade circulante desses subtipos (ASHEG *et al.*, 2003). A defesa envolve linfócitos T dos três tipos de receptor TCR (γδ, αβ Vβ1 e αβ Vβ2). As células TCRVβ1 expressam menores quantidade de CD28 do que as células TCRVβ2, indicando menor grau de ativação destas. Ambos os TCRαβ podem expressar em sua superfície CD4 simultaneamente com CD8αα. Após a imunização, um aumento na quantidade circulante de TCR está associado à montagem de resposta protetora e efetiva proteção quando submetido

ao desafio. Todavia, respostas distintas podem ser observadas entre a imunização e o desafio (BERNDT *et al.*, 2006).

1.4.2.3 Bronquite Infecciosa (Vírus da Bronquite Infecciosa)

Bronquite infecciosa é uma causa de sérios problemas econômicos na avicultura, e a emergência contínua de novos sorotipos impede o estabelecimento de estratégias de vacinação eficazes (CAVANAGH *et al.*, 2007). A doença ocorre em todo o Brasil. Surtos ocorreram em 2008 em Santa Catarina, e o vírus já foi isolado no Paraná (MENDONÇA *et al.*, 2009).

A Bronquite Infecciosa (BI) é causada por um *Coronavirus* (IBV), envelopado. Embora cause doença respiratória, afeta também rins, gônadas e outras superfícies epiteliais. A infecção inicia-se no trato respiratório superior, e dentro de três dias os níveis virais atingem o ápice, permanecendo assim por mais até cinco dias (até o dia 8 pi). Infecções bacterianas secundárias podem ser a principal causa de mortalidade e doença debilitante. A infecção pode progredir para rins (causando nefrite), esôfago, Bursa de Fabrícius, intestinos, tonsilas cecais, testículos e oviduto. Infecção entérica não se manifesta clinicamente, mas o vírus pode ser espalhado pelas fezes. A infecção do oviduto pode reduzir a produção de ovos. O vírus pode estabelecer infecções persistentes em galinhas, retornando a replicar-se em situações de estresse (CAVANAGH, 2007; MENDONÇA *et al.*, 2009).

Diferentes cepas têm tropismos diferentes entre si (RAJ e JONES, 1996), e a imunidade adquirida contra uma cepa é incapaz de conferir proteção contra uma cepa heteróloga (HOFSTAD, 1981). No Brasil, há enorme variedade de ocorrências de tipos de IBV, e acredita-se que os diferentes sorotipos ocorrentes no País podem ser responsáveis pelo aparecimento de surtos, uma vez que a vacina licenciada, do tipo Massachusetts (Mass), não é mais capaz de conferir proteção contra a variedade circulante de vírus. Dos casos de Bronquite Infecciosa, entre 25 e 36% são do tipo Mass (SILVA, 2010). Sessenta e cinco por cento de galinhas de criação fora do sistema industrial, no Rio Grande do Sul são portadoras do vírus de BI (SANTOS *et al.*, 2008).

A imunidade depende da resposta celular, em grande parte, sendo mediada por células $CD8^+$, que atinge seu nível máximo entre os dias 8 e 10 pi, enquanto a resposta de anticorpos é indetectável antes disso (SEO e COLLISSON, 1997).

1.4.2.4 Doença de Gumboro (Vírus da Doença de Gumboro)

A doença de Gumboro, ou doença da Bursa, é causada pelo vírus da doença de Gumboro (Infectious Bursal Disease Virus – IBDV), pertencente à família *Birnaviridae*. É uma doença altamente contagiosa e imunossupressiva, que se replica nas células IgM^+ na Bursa, e o hospedeiro pode morrer durante a fase aguda da doença (BALAMURUGAN e KATARIA, 2006). A quantidade de linfócitos B ($Bu^+MHC\ II^+$) na Bursa é bastante reduzido a partir do dia 7 pi (PETKOV *et al.*, 2009). A doença provoca inflamação na Bursa de Fabrícius (órgão linfoide primário de aves), hemorragia em músculos esqueléticos e morte (NAGARAJAN e KIBENGE, 1997). Mesmo vacinação com vírus atenuado pode levar a imunossupressão (SAHAR *et al.*, 2004). Infecção em idade jovem compromete significativamente a imunidade humoral e mediada por células, já que outros órgãos linfoides também podem ser afetados pela infecção e mais de um receptor é provavelmente responsável pela ligação entre o vírus e as células afetadas (CORLEY e GIAMBRONE, 2002; BALAMURUGAN e KATARIA, 2006; ZHU *et al.*, 2008).

Aves de diferentes haplótipos de MHC apresentam resistências variadas contra a doença, e aves mais responsivas apresentam menor quantidade de lesões na Bursa, e em especial uma resposta de CD4 restrita a MHC II. Considerando-se os leucócitos circulantes, há aumento na quantidade de expressão de CD4 e MHC II nas células positivas para esses marcadores entre os dias 6-8 pós infecção, mas o mesmo não ocorre para células $CD8^+$ ou MHC I^+. O peso da Bursa de Fabrícius, a razão do peso da Bursa:peso corporal, o peso corporal e a quantidade de anticorpos circulantes não são eficazes para prever ou estimar a proteção conferida pela vacinação. O haplótipo associado a galinhas não-selecionadas está associado à maior recuperação da doença e resposta imune, como descrita acima, do que haplótipos de aves selecionadas para alta produção de carne ou ovos (JUUL-MADSEN *et al.*, 2002; BOLIS *et al.*, 2003). Cerca de 80% de galinhas de criação não-comercial no Rio Grande do Sul são portadoras do vírus de Gumboro (SANTOS *et al.*, 2008).

1.4.3 Imunossenescência e Fenótipo Imunológico de Risco

Nos últimos anos, o tema de imunossenescência tem sido bastante explorado em uma série de estudos que envolvem a imunofenotipagem de pessoas idosas (WIKBY *et al.*, 1994; FERGUSON *et al.*, 1995; PAWELEC *et al.*, 2002). Esse termo define todas as alterações pelas quais passa o sistema imune durante o envelhecimento, e que levam à uma redução na sua funcionalidade (PAWELEC, 1999). Desde então, foram identificadas uma série de mudanças imunológicas que podem ocorrer ao longo da vida de uma pessoa. Em conjunto, essas alterações do sistema imune determinam uma taxa de mortalidade 2,5 vezes maior aos indivíduos que as sofreram, e por isso foram denominadas de Fenótipo Imunológico de Risco (WIKBY *et al.*, 2005).

Acredita-se que o desenvolvimento do Fenótipo Imunológico de Risco seja dependente em grande parte a infecções persistentes, em especial por citomegalovírus, em humanos (PAWELEC *et al.*, 2004).

No presente trabalho, a aplicação desse conceito servirá a dois propósitos. Inicialmente, a identificação de parâmetros por citometria de fluxo que sejam consistentemente ligados a diferentes desafios, e assim podem-se ter marcações imunológicas que caracterizem um estado de desafio ao animal analisado. A segunda aplicação refere-se à capacidade dos parâmetros citométricos em predizer uma situação de risco para os animais. Ao contrário dos estudos de Pawelec, Wikby e Ferguson, o risco a ser analisado não é aumento de taxas de mortalidade em longo prazo, ligado a idade avançada, mas perdas na capacidade produtiva dos animais. Visto que o objetivo central deste estudo está centrado na produção animal, o conceito de imunossenecência não se apõe literalmente, visto que o período produtivo nas granjas comerciais é muito curto e os animais não atingem idades avançadas, mas ligam-se às perdas que se pode ter pelas alterações imunológicas. Para abordar o tema de risco imune, o experimento utilizado apresenta metodologias similares aos usados pelos grupos citados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo principal do trabalho é utilizar a citometria de fluxo como método de avaliação do sistema imune de galinhas, considerando as diferentes subpopulações de células mononucleares através das moléculas expressas em suas respectivas superfícies. Pretende-se compreender quais parâmetros dentre os testados neste trabalho são importantes durante o processo saúde/doença. Espera-se assim poder obter, dentre essas aferições, um ou mais parâmetros que sejam preditivos/prognósticos durante processos patogênicos ou quaisquer outros processos que alterem o sistema imunológico. A partir dos dados obtidos no presente trabalho, espera-se poder aplicar a citometria de fluxo em situações “de campo”, auxiliando empresas e produtores da cadeia da avicultura. Portanto, pretende-se padronizar a citometria como uma técnica rápida e eficaz para predizer o estado imunitário das aves de criação, podendo vir a ser uma ferramenta útil que influencie o modo com que as aves serão manejadas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Reproduzir e padronizar a técnica de imunofluorescência por citometria de fluxo para a contagem de células de sangue periférico de galináceos;

2) Compreender a dinâmica dos parâmetros imunes avaliados por citometria de fluxo durante estados de saúde/higidez e situações variadas de infecção/doença, utilizando-se de aves em situações controladas (*specific pathogen free* - SPF) de modo a poder escolher parâmetros que solidamente reflitam o estado imunológico dos animais para serem utilizados em rotina;

3) Precisar em quanto as alterações imunes aferidas por esta metodologia interferem e afetam a capacidade produtiva dos animais e quais os

mecanismos pelos quais esses parâmetros avaliados pela citometria de fluxo estão envolvidos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AVES

Para o presente trabalho, foram utilizados 142 frangos, entre galos e galinhas (*Gallus gallus domesticus*), de diferentes raças e idades (especificadas abaixo, em cada experimento). Todos os animais foram mantidos em condições apropriadas para a espécie. Todos os procedimentos foram aprovados em comitê de ética de pesquisa envolvendo animais (UFPR, certificado número 517).

3.2 SANGUE HUMANO

Sangue humano foi coletado de um único indivíduo voluntário e sadio. As coletas foram feitas durante as semanas em que se realizou o experimento “Efeitos dos parâmetros imunes sobre a produtividade e mecanismos de ação destes parâmetros” (item 3.7.6). Após a coleta, o sangue era então colocado em tubo contendo anticoagulante (Comitê de Ética em Pesquisa PUC/PR 1582).

3.3 COLETA DE SANGUE

Coleta de sangue dos frangos foi realizada com seringa e agulha estéreis, através de punção da veia Ulnar Cutânea (FIGURA 2), utilizando-se dos protocolos-padrão de contenção dos animais e assepsia (FAO, 2002). Em aves muito jovens (menos de duas semanas de vida) ou que sofreriam eutanásia em seguida, a coleta foi feita através de punção cardíaca. Após a coleta, o sangue era então colocado em tubo contendo anticoagulante. Os anticoagulantes usados no presente trabalho foram heparina, EDTA e citrato de sódio.

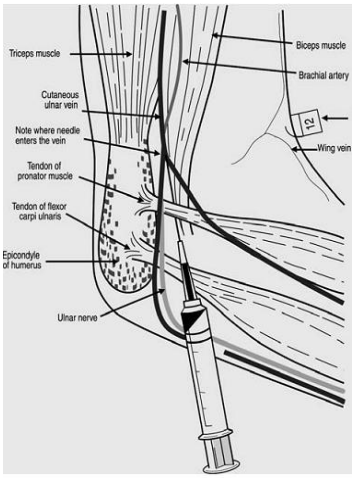


FIGURA 2 – MÉTODO DE COLETA DE SANGUE.
POSIÇÃO DA VEIA ULNAR CUTÂNEA NA ASA DE GALINHAS USADA PARA COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO (FAO, 2002).

3.4 AGENTES INFECCIOSOS UTILIZADOS NOS DESAFIOS

Para o presente estudo foram utilizados quatro agentes infecciosos em experimentos de desafio aos frangos. Foram realizados dois experimentos independentes. O primeiro utilizou aves SPF infectadas com *Eimeria* spp., *Salmonella enteritidis*, Vírus da Doença de Gumboro e Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas. O vírus da Bronquite Infecciosa foi utilizado em galos adultos no segundo experimento, mas de cepa diferente da utilizada no primeiro teste. As cepas utilizadas estão discriminadas nas seções dos experimentos, abaixo.

3.5 EUTANÁSIA

O procedimento de eutanásia foi realizado nos animais que sofreram punção cardíaca ou ao final dos experimentos. Eutanásia foi feita por deslocamento cervical dos animais anestesiados por cetamina e xilazina (GUIMARÃES e MORAES, 2000).

3.6 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES E MARCAÇÃO PARA ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO

Células mononucleares foram separadas do sangue total através de separação por gradiente de densidade utilizando ficoll (Histopaque-1077® - Sigma-Aldrich), de acordo com protocolo já estabelecido (FAIR *et al.*, 2008). Em síntese, o sangue deve ser diluído 1:1 em PBS (tampão salino tamponado de fosfato - *phosphate buffered saline*, pH 7,4) para um volume final de 2 ml. Essa diluição deve ser colocada por cima de 1 ml de Histopaque-1077 em um tubo de 15 ml. As amostras devem ser centrifugadas em centrífuga Eppendorf a 400xg, por 30 minutos a temperatura ambiente.

O sedimento (*buffy coat*) resultante de células brancas acima dos eritrócitos deve ser então coletado e transferido para outro tubo de 15 ml. As células devem ser lavadas duas vezes com 4 mL de PBS e centrifugadas a 400xg por 7 minutos. O sedimento final deve ser ressuspendido em 1 ml de solução de paraformaldeído em PBS 1% para a fixação das células. Trinta minutos após a ressuspensão, as células devem ser centrifugadas a 400xg por 7 minutos, o sobrenadante deve ser descartado, as células devem ser lavadas duas vezes com PBS e centrifugadas à mesma velocidade e tempo. O sedimento final deve ser ressuspendido em PBS com BSA 1% (Albumina de soro bovino - *Bovine serum albumine*). As células devem ser contadas utilizando uma câmara de contagem de Neubauer. Marcação única ou dupla deve ser realizada para todos os anticorpos usando anticorpo primário diluído 1:10 em PBS (pH 7,4) (anticorpos nas seguintes concentrações: 0,5 mg/ml para os anticorpos conjugados com FITC e 0,1 mg/ml para os anticorpos conjugados com PE). Esta diluição deve ser então misturada com 10^6 células mononucleares e mantida à temperatura ambiente (cerca de 21^{o}C) no escuro por 20 minutos. Após este período de incubação, as células devem ser lavadas com 2 ml de PBS, centrifugadas a 400xg por 7 minutos. O sobrenadante deve ser descartado. As células podem receber o anticorpo secundário (1µl de diluição de 1:1000) ou Estreptavidina FITC (concentração de 0,5 mg/ml) (diluído 1:10), de acordo com a exigência. As células devem ser mantidas por 20 minutos em temperatura ambiente no escuro, e em seguida lavadas com 2 mL de PBS e centrifugadas. O sedimento final deve ser ressuspendido em 250µl de PBS com BSA 1%.

3.7 ANTICORPOS

Os anticorpos monoclonais primários anti-proteínas de superfície celular de frangos (TABELA 1) foram adquiridos da Southern Biotechnology Associates, Inc. Os anticorpos usados para detectar os antígenos de superfície celular de leucócitos estão na tabela 1. Anticorpo secundário (usado para MHC classe II e para anticorpo controle isotípico) foi Fluoresceína (FITC) AffiniPure fragmento F(ab')2 de cabra anti-camundongo IgG+IgM (H+L) da Accurate Chemical & Scientific Corp. Conjugado de Streptavidina FITC (para anticorpos primários biotinilados – ver Tabela 1) da SouthernBiotech, específico para d-Biotina, de *Streptomyces avidinii*.

3.8 CITOMETRIA DE FLUXO

Todas as amostras passaram por citometria dentro de 4 horas após a marcação. A citometria de fluxo foi realizada em um citômetro de fluxo FACSCalibur® (Becton Dickinson). Fluorescência verde (fluorescência de FITC) foi detectada no canal FL1 (nm 530/30), e fluorescência laranja (de PE) foi detectada no canal FL2 (nm 585/42). As células foram analisadas em pelo menos 10.000 eventos no *gate* de linfócitos (com base na dispersão frontal e lateral (FSC e SSC), o que inclui trombócitos contaminantes, de morfologia muito semelhante aos linfócitos (BOHLS *et al.*, 2006). Os dados foram analisados com o software FlowJo® (TreeStar) ou WinMDI 2.9 (Joseph Trotter).

Antígeno de superfície celular[2]	Animal de origem, Clone, Isotipo	Especificidade[1]	Conjugação ou fluoróforo[3]
CD4	Camundongo, CT-4, $IgG_{1κ}$	Linfócitos T auxiliares Duplo-positivas ($CD4^+/CD8^+$)	Biotina/FITC
CD8 α	Camundongo, CT-8, $IgG_{1κ}$	Linfócitos T citotóxicos Duplo-positivas ($CD4^+/CD8^+$)	R-PE
CD8 β	Camundongo, EP42, $IgG2_{aκ}$	Linfócitos T citotóxicos	Biotina/FITC
CD28	Camundongo, AV7, $IgG_{1κ}$	Linfócitos T de memória ou virgens	Biotina/FITC
TCR αβ Vβ1 (TCR2)	Camundongo, TCR2, $IgG_{1κ}$	Linfócitos T	FITC/R-PE
TCR αβ Vβ2 (TCR3)	Camundongo, TCR3, $IgG_{1κ}$	Linfócitos T	FITC/R-PE
MHC I	Camundongo, F21-2, $IgG_{1κ}$	Todas as células nucleadas	Biotina/R-PE
MHC II	Camundongo, 2G11, $IgG_{1κ}$	Células apresentadoras de antígeno	Anticorpo primário/R-PE
Bu1	Camundongo, AV20, $IgG_{1κ}$	Linfócitos B	FITC
Kul	Camundongo, KUL01, $IgG_{1κ}$	Macrófagos/monócitos	FITC
CONTROLE ISOTÍPICO $IgG_κ$ DE CAMUNDONGO	Camundongo, 15H6, $IgG_{1κ}$	Controle isotípico especificidade para micotoxina T2	Anticorpo primário

[1]REFERÊNCIAS: (HALA *et al.*, 1981; CHAN *et al.*, 1988; LAHTI *et al.*, 1991; LINSLEY e LEDBETTER, 1993; TREGASKES *et al.*, 1995; LUHTALA *et al.*, 1997a)

[2]TODOS OS ANTICORPOS PRIMÁRIOS POR SOUTHERN BIOTECH

[3]FITC – FLUORESCEÍNA ISOTIOCIANATO

R-PE – FICOERITRINA

TABELA 1 - ESPECIFICIDADE ANTIGÊNICA DE CADA ANTICORPO[1].

ANTICORPOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO, E O SUBGRUPO CELULAR RESPECTIVO RECONHECIDO E A CONJUGAÇÃO OU FLUORÓFORO DE CADA. OCASIONALMENTE MAIS DE UMA CONJUGAÇÃO FOI UTILIZADA. ANTICORPOS MARCADOS COM BIOTINA RECEBERAM STREPTAVIDINA-FITC COMO MARCAÇÃO SECUNDÁRIA.

3.9 EXPERIMENTOS

3.9.1 Padronização da técnica

3.9.1.1 Testes de anticoagulantes

Para que se pudesse comparar a capacidade de preservação de cada anticoagulante e a sua aplicabilidade na extração linfocitária, sangue coletado de uma galinha mestiça foi conservado em EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e em solução anticoagulante de Alsever (receita em (FAO, 2002). A extração por Histopaque® foi realizada dentro de 3 horas após a coleta das amostras. O protocolo usado para extração das células linfocitárias e a imunomarcação seguiram o protocolo usado por FAIR et al., 2008, que difere do citado acima principalmente na proporção de ficoll:sangue usado na extração (2ml de sangue diluído em PBS+BSA 1% para 3 ml de Histopaque-1077) e na incubação dos anticorpos com as amostras, realizada em temperatura ambiente (21^{o}C), ao invés de a 4^{o}C. Apenas os anticorpos anti-CD4 (incubado com Streptavidina-FITC) e CD8α conjugado a ficoeritrina (*phycoerythrin* - PE) foram usados para a marcação das células, na concentração de 1µg/10^{7} células. As diluições utilizadas seguiram as recomendações dos fabricantes (anticorpos e Streptavidina FITC são da Southern Biotech Associates).

No mesmo dia, as células foram analisadas em citômetro; o equipamento utilizado foi um citômetro FACScalibur Becton Dickinson, utilizando o software Cell Quest. Para análise dos dados, foi gerado um gráfico de tamanho (dispersão frontal, forward scatter ou FSC) versus complexidade interna (dispersão lateral, side scatter ou SSC), e foi delimitada uma região que contivesse as células linfocitárias.

3.9.1.2 Teste de Temperatura e Modo de envio das amostras com EDTA ou heparina

Para padronizar o método de coleta e envio das amostras, foi realizado teste usando diferentes condições de temperatura, anticoagulantes e turbulência no transporte.

Sangue coletado de uma galinha mestiça foi dividido em alíquotas, e cada uma delas foi armazenada diferencialmente em EDTA ou heparina. Foram mantidas

a temperatura ambiente (cerca de 21^{o}C) ou em caixa de isopor com gelo reciclável (cerca de 4^{o}C). As amostras preservadas em EDTA ainda foram transportadas de duas maneiras diferentes. Uma alíquota foi transportada com cuidado para evitar lise de células, enquanto a outra foi carregada de modo turbulento, propositadamente movimentando-se fortemente a amostra. Todas as alíquotas foram avaliadas dentro de 24 horas da coleta por citometria de fluxo usando o marcador CD8α.

3.9.1.3 Testes dos demais anticorpos

Os procedimentos realizados no experimento para teste de anticoagulantes foram repetidos com o objetivo de marcar novos linfócitos. Para isso, foram utilizados os seguintes anticorpos primários: TCRVβ1 (conjugado a FITC), TCRVβ2 (conjugado a FITC), CD28 (biotinilado), CD8β (biotinilado), MHC I (biotinilado) e MHC II (anticorpo purificado). Os anticorpos biotinilados receberam em seguida Streptavidina conjugada a FITC, e o anticorpo purificado (MHC II) recebeu um anticorpo secundário Goat Anti-Mouse FITC na diluição de 1:200 (Accurate Chemical). O sangue coletado foi preservado em EDTA, e os linfócitos foram extraídos do sangue total no mesmo dia por meio de flutuação em Histopaque. Como a análise por citometria foi feita apenas no dia seguinte, as células marcadas foram fixadas e mantidas *overnight* em solução de paraformaldeído 2% em PBS, pH 7,4.

3.9.2 Aves Livres de Patógenos Específicos

Vinte e uma galinhas da linhagem de postura White Leghorn oriundas de uma granja livre de patógenos específicos (specific-pathogen-free – SPF) (Laboratório Biovet®) foram usadas neste estudo para avaliação por citometria de fluxo das diferenças por faixa etária. Os parâmetros avaliados por citometria foram feitas por marcações simples (sem combinação de anticorpos): CD4, CD8α, CD8β, MHC I, MHC II, TCRVβ1, TCRVβ2 e CD28. Essas aves nunca haviam sido imunizadas e eram de quatro faixas etárias diferentes: 1 dia de vida (n=7), 5 semanas de vida (n=4), 12 semanas de vida (n=5) e 60 semanas de vida (n=5). Os frangos foram alimentados de acordo com as suas idades, utilizando-se ração peletizada de diferentes granulometrias livre de antibióticos. Amostras de ração de

cada grupo etário foram coletadas à época da coleta de sangue, e foram enviadas para análise para presença de micotoxinas (análise feita pelo Laboratório de Análises Micotoxicológicas – Universidade Federal de Santa Maria) (ANEXO 1).

Sangue de todas as aves foi coletado no mesmo dia. Os leucócitos mononucleares periféricos foram analisados por citometria de fluxo usando os 8 anticorpos citados, e foram também utilizados para análise por um leucograma.

O leucograma para a contagem absoluta de linfócitos foi feito por Lab&Vet, São Paulo, SP utilizando câmara de Neubauer e contagem diferencial por extensão em lâmina. A extensão das lâminas foi feita dentro de uma hora após a coleta.

A contagem absoluta de linfócitos no sangue foi realizada pela multiplicação do número absoluto de linfócitos por microlitro de sangue pela porcentagem de cada subpopulação de linfócitos obtida pela citometria de fluxo.

3.9.3 Comparação de aves comuns de diferentes linhagens versus aves SPF

Para compreender a influência do ambiente nos resultados de parâmetros imunes medidos por citometria de fluxo foram comparadas as 21 aves SPF utilizadas no experimento acima descrito e 27 aves mantidas em condições comuns (submetidas à imunização e em ambiente não-controlado). As aves utilizadas tinham idades variadas (entre 1 dia de vida e 60 semanas de vida). A idade entre ambos os grupos foi pareada. As aves foram comparadas em relação aos parâmetros de marcação simples CD4, CD8α, CD8β, MHC I, MHC II, TCRVβ1, TCRVβ2 e CD28.

3.9.4 Aves em condição SPF sob desafio de infecção experimental

Com o objetivo de esclarecer as flutuações dos parâmetros citométricos sob diferentes condições de desafio, galinhas SPF de linhagem de postura (White Leghorn) foram submetidas a infecções por quatro agentes infecciosos diferentes: Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (IBV), Vírus da Doença de Gumboro (Infectious bursal disease virus – IBDV), *Eimeria* spp., agente causador de coccidiose e *Salmonella enterica* serovar Enteritidis – *Salmonella enteritidis* (SE). As cepas e vacinas utilizadas foram cedidas por Biovet®. Grupos contendo 10 aves cada, mantidos em isoladores estéreis do laboratório Biovet®, foram inoculados com

um agente conhecido diferente para cada grupo. Posteriormente, foram comparados com um grupo controle o qual não recebeu qualquer desafio microbiano. Assim, um total de 50 aves SPF foram utilizadas para este experimento. A tabela abaixo (2) demonstra o modo de infecção utilizado.

Agente	Dose	Via de infecção
Eimeria **Biococcivet R (part. 918/09)**[1]	25x a dose recomendada	Via oral
Salmonella enteritidis **PT4**	10^8 UFC/dose	Via oral
IBV	0,7 mL da suspensão c/ $10^{5,2}$ DIE_{50}/mL[2]	Via ocular/nasal
IBDV GBV8	10^7 DIE_{50}/dose	Via ocular/nasal
IBDV G11	$2,18x10^2$ DIE_{50}/dose	Via ocular/nasal

[1] PARA A INFECÇÃO POR COCCIDIOSE, FOI UTILIZADA A VACINA BIOCOCCIVET R, DE AGENTE VIVO, EM DOSE MAIOR DO QUE A RECOMENDADA

[2] DIE: DOSE INFECTANTE EM EMBRIÃO

TABELA 2 – AGENTE INFECCIOSO UTILIZADO E MODO DE INFECÇÃO.

A coleta de sangue e avaliação por citometria de fluxo ocorreu após 7 dias do desafio com os agentes infecciosos. Neste experimento, foram utilizadas outras duplas marcações assim como utilizado na marcação de células com CD8α e CD28, para facilitar o delineamento de outras subpopulações. As marcações realizadas foram CD8α/CD28, CD4/CD8α, CD8α/TCRVβ1, CD8α/CD8β, MHC I, MHC II e TCRVβ2.

O leucograma para a contagem absoluta de linfócitos foi feito por Lab&Vet, São Paulo, SP (ANEXO 2).

A contagem absoluta de linfócitos no sangue foi obtida através da multiplicação do número absoluto de linfócitos por microlitro de sangue pela porcentagem de cada subpopulação de linfócitos obtida pela citometria de fluxo.

3.9.5 Experimento Bronquite Infecciosa das Galinhas

Feito em parceria com a Universidade de São Paulo. Exemplo do uso dos parâmetros da citometria para compreensão do sistema imune.

Um novo experimento foi realizado para avaliar a resposta imune de frangos contra IBV. Vinte e três galos (mantidos em condições comuns, não-SPF) com 23 semanas de vida foram infectados com o vírus da Bronquite Infecciosa (IBV), de uma cepa diferente da descrita na literatura, cuja característica esperava-se ser supervirulenta, por descrições de campo. A cepa denomina-se CRG33, variante brasileira. Notar que a cepa utilizada neste experimento foi diferente da utilizada para a infecção de galinhas SPF. Os galos foram infectados com 100µl de suspensão viral por via oftálmica e aves controle receberam 100µl de PBS. A infecção foi realizada na Universidade de São Paulo (USP), em conjunto com a empresa Intervet. O sangue foi coletado em frascos contendo anticoagulante citrato de sódio e enviado à UFPR nos dias 5, 10, 17, 30 e 45 pós-infecção, sendo o sangue de 2 aves controle e 6 aves infectadas de cada vez. Ao chegar, os linfócitos foram extraídos do sangue e preservados em paraformaldeído 2% para posterior utilização. As amostras foram avaliadas até 3 dias após a sua chegada. Foram marcadas com os anticorpos CD4, CD8α, CD8β, MHC I, MHC II, TCRVβ1, TCRVβ2 e CD28 em marcação simples, e nos dias 17, 30 e 45, a marcação dupla de CD8α/CD28 foi utilizada.

3.9.6 Efeitos dos parâmetros imunes sobre a produtividade e mecanismos de ação destes parâmetros

Para compreender como os parâmetros medidos por citometria de fluxo afetam o desempenho zootécnico de frangos de corte, 25 aves de linhagem de corte (Ross), vacinadas contra doença de Marek e Gumboro, foram alojadas em instalação da Universidade Federal do Paraná e monitoradas para ganho de peso diário e conversão alimentar média. A duração do experimento foi de 45 dias, período médio máximo de duração do ciclo de produção de aves de corte. Semanalmente, foram feitas coletas de sangue para citometria de fluxo com o objetivo de imunofenotipar as células mononucleares imunes circulantes. As

subpopulações avaliadas foram: CD4/TCRVβ1; CD8α/CD8β; CD8α/CD28; MHC I; MHC II, TCRVβ2; Macrófagos/MHC II; Linfócitos B. Foram feitas também comparações com outros parâmetros de avaliação imune, de modo a caracterizar a maneira com que os fenômenos avaliados pela citometria do sangue periférico agem sobre o sistema imunológico. As aves foram mantidas em densidade populacional padrão (cerca de 11 aves por m^2).

O manejo das aves cumpriu os requisitos utilizados normalmente em granjas comerciais. A cama de cepilho possuía cerca de 7 centímetros de espessura, e foi revirada de acordo com a necessidade, para evitar umidade excessiva. Alimentação e água foram providas *ad libitum*. A ração oferecida foi trocada conforme a idade dos animais. A área utilizada pelos animais foi restrita nas primeiras semanas, de modo a prover maior conforto térmico para os mesmos (1/4 da área total nos primeiros 8 dias, ½ da área até a 2ª semana, ¾ da área aos 21 dias e a área total até o final do experimento). Aquecimento foi provido nas primeiras 2 semanas.

O desempenho de cada animal foi calculado com base no seu ganho de peso.

$$GDP = \text{Peso no dia (X)} - \text{Peso no dia (X-1)}$$

A conversão alimentar média (CA) para cada animal é calculada por:

$$CA = \frac{[\text{Alimento dado no dia X} - \text{Alimento que sobrou no dia X+1}]/\ N^o \text{ animais}}{\text{GDP do animal no dia}}$$

A CA indica a capacidade de um animal converter o alimento oferecido em ganho de peso. A CA = 1 indica uma capacidade perfeita de conversão, onde cada quilograma de ração é convertido em 1 kg de peso do animal.

Para permitir a comparação entre todos os animais, em todas as fases do experimento, o valor de GDP foi normalizado com relação ao peso médio do grupo dentro da semana considerada. Essa normalização permite comparar os animais de todas as semanas entre si (FIGURA 15):

$GDP_{normalizado\ (norm)}$ = GDP médio do indivíduo na semana/média de GDP de todos os animais em uma semana

O GDP aqui descrito como absoluto também foi normalizado pelo peso do animal, visto que animais maiores têm valores absolutos de GDP maiores, embora ganhem menos peso relativamente. Essa normalização não mantém uma média estável ao longo do período do experimento (FIGURA 16).

GDP = GDP médio do indivíduo na semana/peso do animal no final da semana

Os resultados foram avaliados por conceitos epidemiológicos de risco, para permitir a correlação entre 2 fatores com a ocorrência de um evento. Risco relativo (RR) é calculado pela razão entre os riscos dos grupos exposto ao fator de risco e do grupo não exposto:

RR = Risco dos expostos/Risco dos não-expostos

Risco é calculado como a incidência:

$$\frac{\text{Número de indivíduos acometidos}}{\text{Indivíduos considerados}}$$

Em um dos casos utilizados neste trabalho:

$$RR = \frac{N^o \text{ de animais com } GDP_{norm} \text{ abaixo de 1 para população CD4:CD8 e } CD4^+TCRV\beta1^+\text{altos}}{N^o \text{ de animais com } GDP_{norm} \text{ abaixo de 1 para população CD4:CD8 e } CD4^+TCRV\beta1^+\text{baixos}}$$

Neste trabalho, considerou-se que o grupo exposto é aquele com quantidades altas de células imunes e o grupo não-exposto é aquele com quantidades baixas de células imunes. O risco a que estão expostos é estar no grupo com baixo ganho de peso.

O risco atribuível (RA) é a fração de um evento que se deve a um dado fator. É calculado por:

$$RA = \frac{\text{Incidência nos expostos} - \text{Incidência nos não-expostos}}{\text{Incidência nos expostos}}$$

Em um dos casos utilizados neste trabalho:

RA = (N^o de animais com GDP_{norm} abaixo de 1 para população CD4:CD8 e $CD4^+TCRV\beta1^+$**altos -** N^o de animais com GDP_{norm} abaixo de 1 para CD4:CD8 e $CD4^+TCRV\beta1^+$**baixos**)/ N^o de animais com GDP_{norm} abaixo de 1 para população CD4:CD8 e $CD4^+TCRV\beta1^+$**altos**

Para a determinação do intervalo de confiança dos riscos (95%), utiliza-se a fórmula:

$$IC = Risco \pm 2 \times Raiz\ de\ [Risco \times (1-Risco)/n]$$

Se o intervalo de confiança estiver todo acima do valor 1, confirma-se o aumento do risco conferido pelo fator estudado.

3.9.6.1 Medidas das bursas de Fabrícius

A medida da bursa de Fabrícius foi realizada como uma avaliação imune para ser utilizada como comparação aos resultados da citometria de fluxo. As bursas de Fabrícius de cada uma das 25 aves foram medidas por paquímetro analógico (Eccofer®) (FIGURA 3), aferindo-se o tamanho do órgão em sua posição anatômica, afastando-se o reto, ainda dentro do abdômen da ave. O diâmetro do órgão foi medido em duplicata, para evitar viés por diferenças na exposição da Bursa para a medição dentro do abdômen. Após a primeira aferição, o reto e a Bursa eram soltos dentro do abdômen, para que retornassem às suas posições originais. Uma segunda vez afastava-se o reto para expor a Bursa e medi-la em duplicata. As 11 primeiras aves tiveram o sangue coletado por punção cardíaca sob anestesia geral e analgesia, e após o procedimento sofreram eutanásia por deslocamento cervical. As 11 primeiras Bursas foram medidas neste momento. Para realizar este procedimento, as aves foram submetidas à anestesia e analgesia por protocolo com quetamina (Vetnil®) e xilazina (Vetbrands®) (GUIMARÃES e MORAES, 2000). As bursas das 13 aves restantes (visto que a ave número 25 morreu naturalmente ainda na primeira semana) foram medidas no último dia do experimento (dia 45).

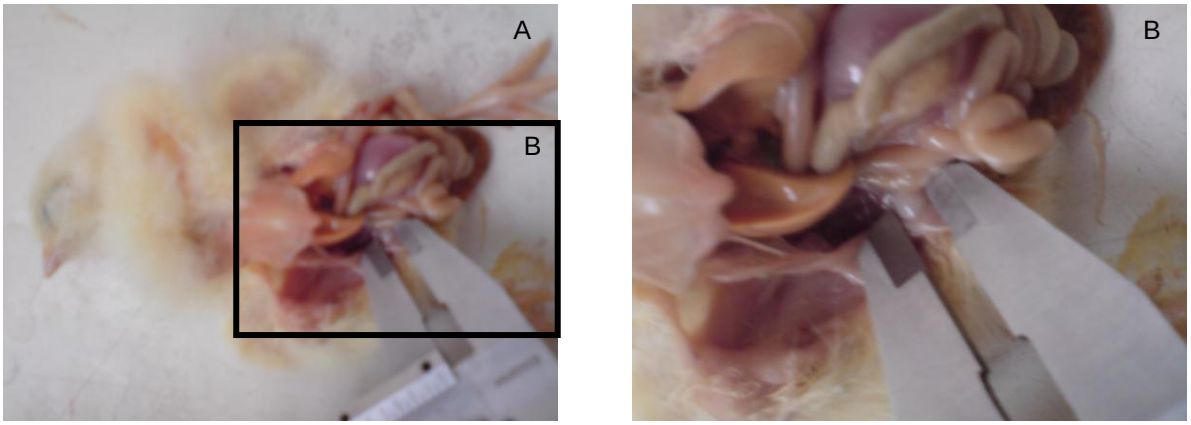


FIGURA 3 – MEDIÇÃO DO TAMANHO DA BURSA DE FABRÍCIUS.
AVE COM ABDÔMEN ABERTO E VÍSCERAS DESLOCADAS PARA EXPOSIÇÃO DA BURSA. O ÓRGÃO FOI MEDIDO SEM SER RETIRADO DA AVE.

3.9.6.2 Teste de hemólise e hemaglutinação e quantificação de IgY total plasmática

Os testes de hemólise e hemaglutinação de eritrócitos humanos pelo plasma de galinhas foram feitos conforme estabelecido por Matson et al. (2005).

Cinquenta microlitros das amostras de plasma são colocadas nas colunas 1 e 2 de uma placa de 96 poços de fundo redondo (em “U”). Vinte e cinco microlitros de salina tamponada de fosfato (PBS) pH 7,4, 0,01M, é adicionada às colunas 2 a 12. O conteúdo dos poços da coluna 2 são serialmente diluídos até a coluna 11. Sangue humano é coletado, plasma é descartado e eritrócitos são lavados com PBS. Eritrócitos são peletizados em centrifugação a 1000g, por 10 minutos. Eritrócitos são diluídos 1:100. Vinte e cinco microlitros dos eritrócitos 1% é adicionado em todos os poços. O conteúdo do poço 12, com PBS e eritrócitos serve como controle negativo da reação. Cada placa é coberta com tampa plástica, agitada levemente por 10 segundos e incubada a 37^{o}C por 90 minutos. Ao final da incubação, o eixo longo da placa é virado em um ângulo de 45º em temperatura ambiente para permitir a vizualização de aglutinação e hemólise. A titulação da capacidade de hemólise e hemaglutinação foram anotadas como a última diluição que gerou uma reação positiva. O resultado é registrado pelo valor da diluição do último poço positivo (a diluição máxima é de 1/512 e o valor registrado foi 0,0019). Assim, quanto mais próximo de zero, maior a capacidade de aglutinar ou hemolisar.

A contagem absoluta de leucócitos foi feita através da contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer, com células coradas por azul de cresil brilhante (0,05%) e por contagem diferencial de leucócitos, por extensão do sangue em lâmina corada com corante de May-Grünwald Giemsa.

Para confirmar o teste de aglutinação, foi realizada a quantificação de IgY no plasma dos animais através de Western Blotting, seguindo a metodologia descrita por Cheng e colegas (2001). O plasma dos treze animais remanescentes no dia 45 de experimento foi analisado por esse método.

Dez microlitros de cada amostra 10 vezes diluída em tampão de corrida não redutor foi desnaturada a 96^{o}C por 3 minutos. As amostras e marcador de peso molecular foram aplicados em gel de SDS-poliacrilamida 10% (dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida). As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada por 1 hora com leite desnatado diluído a 5% em tampão TBST (*Tris buffered saline* e Tween 20) e então incubada por 1 hora com anticorpo conjugado em HRP (*horseradish peroxidase*) (anti-IgG de galinha produzido em cabra – Sigma-Aldrich®). A visualização do complexo formado entre o anticorpo na membrana e o anti-IgG foi feito com solução de quimioluminescência (Pierce®) e filme radiográfico (Kodak®). As bandas impressas nos filmes foram quantificadas em triplicata por densitometria computadorizada (ImageJ®).

3.9.6.3 Imunofluorescência de secções de tecido

Para comparar a quantidade circulante e intestinais de células TCRVβ1^{+}, foi feita contagem dessa subpopulação em secções de tecido marcadas com anticorpo específico. As treze aves remanescentes ao final do experimento (item 3.9.6) foram utilizadas para esta análise.

Imunofluorescência foi feita em cortes congelados de 6µm de intestino delgado e de tonsilas cecais, criopreservados em sacarose 20% e depois sacarose 30%. Após as peças afundarem na sacarose, foram envolvidas em *Optimal Cutting Temperature* (OCT) (Sakura®) e congeladas rapidamente em nitrogênio líquido. Os blocos de OCT contendo o tecido foram preservados em freezer -80^{o}C até que fossem cortadas as secções.

Os cortes eram coletados em lâminas pré-preparadas com gelatina (2%). As secções eram imediatamente fixadas em etanol 95%, por 30-45 segundos, e então

deixadas para secar a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas eram congeladas a -20^{o}C até que fosse realizada a imunofluorescência.

Imunofluorescência foi feita como se segue:

1) Lâminas foram retiradas do freezer -20^{o}C e lavadas 3 vezes com PBS por 5 minutos, à temperatura ambiente;
2) Cortes foram bloqueados por 60 minutos com PBS contendo albumina sérica bovina (BSA) diluída a 1% e com soro de cabra (NGS) diluído a 5%;
3) Anticorpo específico para TCRVβ1 (SouthernBiotech, camundongo anti-receptor de galinhas, anticorpo primário com fluorescência ficoeritrina) foi diluído 1:400 na solução de PBS com BSA 1% e NGS 5% e aplicado sobre os cortes histológicos. Permaneceu a 4^{o}C, *overnight*.
4) No dia seguinte, lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS;
5) Contramarcação do núcleo foi feita com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole) (Sigma-Aldrich). DAPI foi aplicado sobre os cortes e permaneceu por 5 minutos;
6) DAPI foi retirado e lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS;
7) Lâmínula foi montada sobre o corte histológico com meio de montagem para fluorescência (DAKO® Fluorescent mounting media).

As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus IX71®), com excitação do fluoróforo no comprimento de 488nm. A fluorescência resultante da excitação da ficoeritrina (PE) é amarela. A manutenção da morfologia do tecido foi confirmada por coloração de outra lâmina por hematoxilina e eosina. Três cortes de cada órgão de cada ave foram fotografados, no aumento de 26 vezes, contando-se três campos de cada secção, totalizando nove campos para o intestino e nove para a tonsila cecal de cada animal. A contagem da marcação positiva nas secções foi feita em programa de análise de imagens (Image Pro Plus®). Os eventos positivos foram contados pela sua área, e não pelo número de eventos, para evitar contagem inferior à real que ocorre quando duas células marcadas estão parcialmente sobrepostas.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A porcentagem média, desvio-padrão, erro padrão, teste de ANOVA, análise de correlação de Pearson, teste T de Student e teste de Fisher PLSD para diferença estatística entre grupos ($P \leq 0,05$) foram feitos usando StatView® (SAS Institute, Inc.). Gráficos foram gerados utilizando o programa GraphPad Prism® 5 (GraphPad Software, Inc.).

4 RESULTADOS

4.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA

Os primeiros experimentos procuraram reproduzir e padronizar a metodologia de extração e marcação de células imunes do sangue periférico de galináceos para aplicação em citometria de fluxo (BRIDLE *et al.*, 2006; FAIR *et al.*, 2008). Como se pretende que o método venha a ser aplicado de forma ampla, servindo a diferentes agentes envolvidos na avicultura, foi fundamental saber quais são as condições necessárias para que se obtivesse resultados consistentes entre amostras recebidas de diferentes locais.

4.1.1 Padronização para definir o anticoagulante a ser utilizado – EDTA e heparina são similares para citometria de fluxo

Abaixo seguem gráficos representativos dos resultados obtidos de proporções de eventos em relação ao controle (FIGURA 4) utilizando-se diferentes anticoagulantes. A marcação para CD4 e CD8α foi reduzida quando o sangue foi preservado em Alsever. Quando a comparação foi feita entre EDTA e heparina, os resultados foram similares (FIGURA 5).

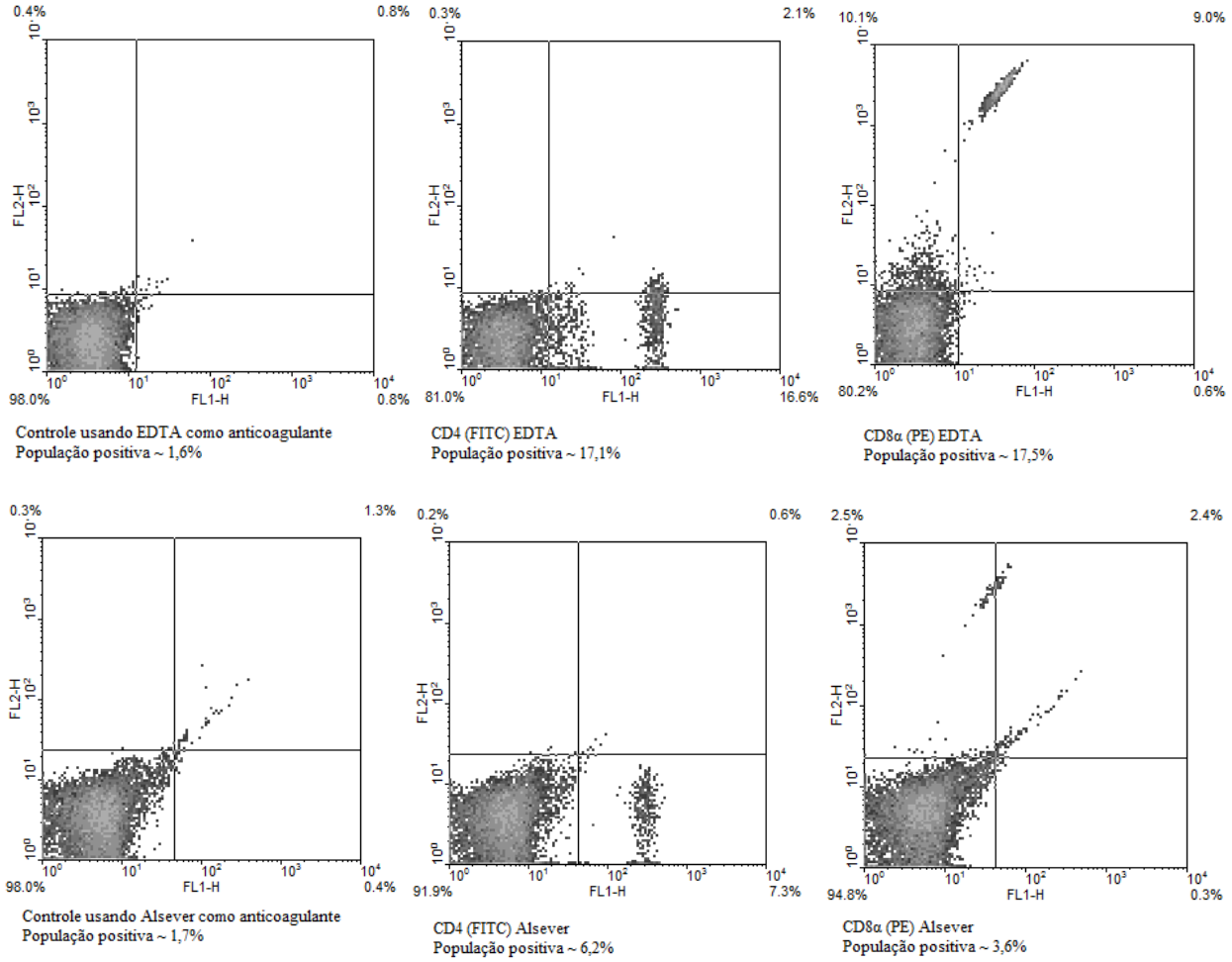
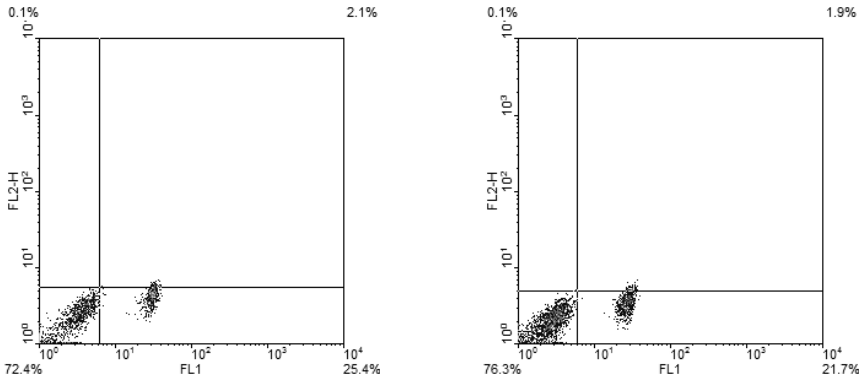


FIGURA 4 – COMPARAÇÃO ENTRE EDTA E ALSEVER.
GRÁFICO DE DENSIDADE CELULAR DE CD4 E CD8A EM EDTA OU ALSEVER



(A) (B)

FIGURA 5 – COMPARAÇÃO ENTRE EDTA E HEPARINA.
GRÁFICOS DE DENSIDADE CELULAR DE CÉLULAS CD4 COMPARANDO OS ANTICOAGULANTES EDTA (A) E HEPARINA (B)

4.1.2 Teste de temperatura e modo de envio das amostras com diferentes anticoagulantes

Um curto teste foi feito de modo a verificar qual seu impacto sobre as amostras de sangue, visto que era esperado que se passasse a receber amostras via postal, onde nem sempre a temperatura é mantida ótima. Já havia sido reportado que a população de células citotóxicas é a mais suscetível a alterações devido à temperatura (EKONG *et al.*, 1993). Por essa razão, o anticorpo utilizado para este teste foi o anti-CD8, que é um marcador de células citotóxicas. As temperaturas testadas foram de 4^{o}C e 25^{o}C. Adicionalmente, foram testados os anticoagulantes heparina e EDTA, em que as amostras de EDTA foram transportadas sob estrito cuidado para evitar movimentação e possível lise de células, ou foram transportadas sem atenção à sua movimentação. Esta variação novamente poderia ser importante quando se considera o envio postal das amostras. Os resultados de citometria de fluxo para as marcações dos linfócitos de aves nas condições descritas acima estão ilustrados na Figura 6.

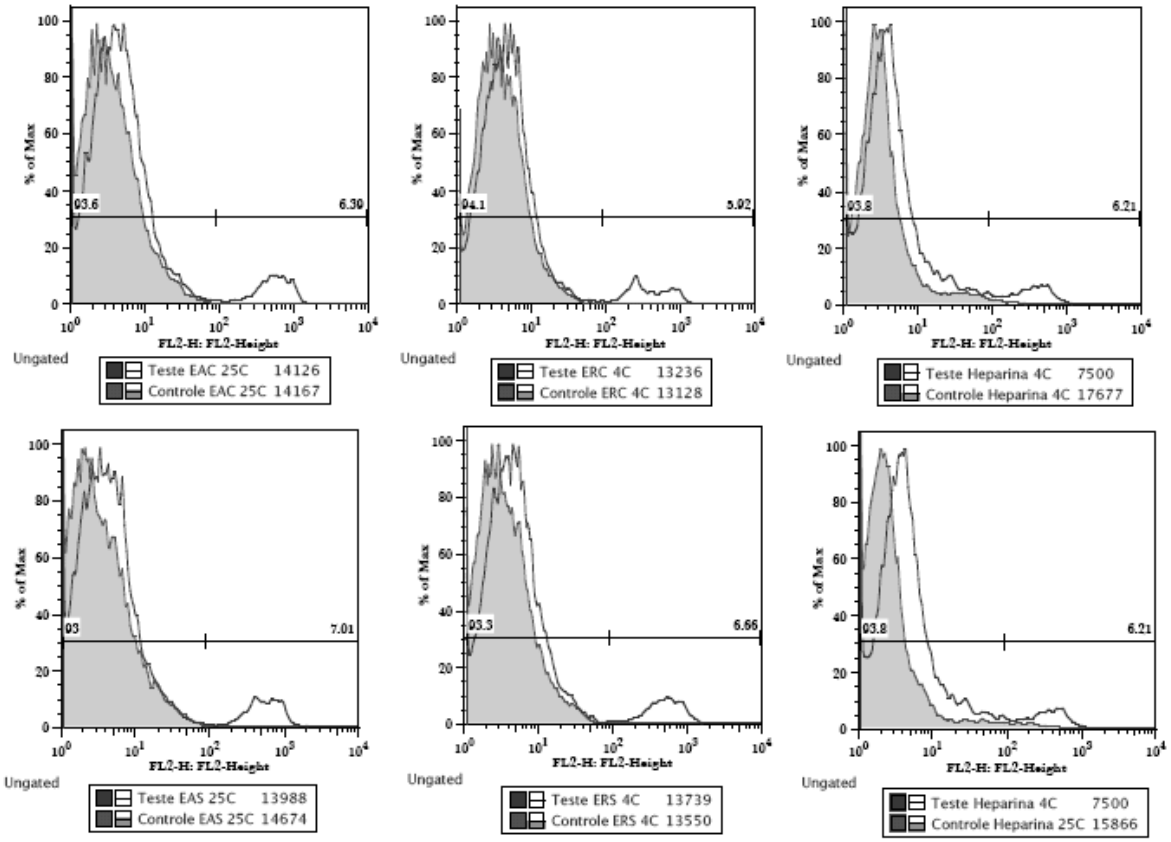


FIGURA 6 – TRANSPORTE DIFERENCIADO ENTRE AS AMOSTRAS.
EXEMPLO DAS AMOSTRAS COM ANTICOAGULANTE EDTA OU HEPARINA, MARCADAS POR CD8A TRANSPORTADAS A 4^{O}C OU 25^{O}C. AS AMOSTRAS EM EDTA PASSARAM PELO TESTE ADICIONAL DE “QUALIDADE DO TRANSPORTE”, COM AMOSTRAS EM CONDIÇÃO ÓTIMA de cuidado (EAS ou ERS) ou em transporte turbulento (ERC ou EAC)

4.1.3. Padronização dos demais anticorpos

Abaixo seguem gráficos representativos dos resultados obtidos da fluorescência da amostra comparada ao controle (anticorpo secundário) para os ensaios de citometria de fluxo usando os demais anticorpos (FIGURA 7).

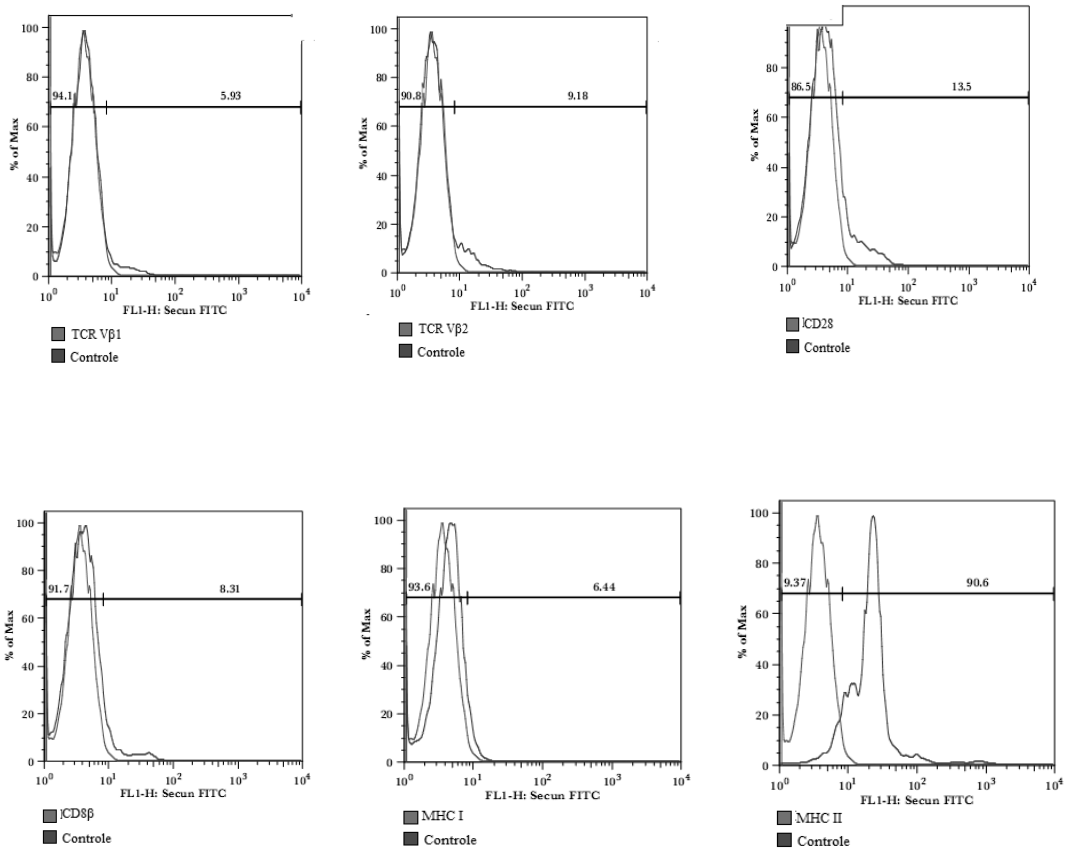


FIGURA 7 – TESTE DOS ANTICORPOS.
FLUORESCÊNCIA DAS AMOSTRAS COMPARADAS AO CONTROLE

4.2 AVES LIVRES DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS (*SPECIFIC PATHOGEN FREE* – SPF) E OS PARÂMETROS CITOMÉTRICOS DE IMUNIDADE AO LONGO DE SEU DESENVOLVIMENTO

Neste experimento, galinhas mantidas em condições livres de patógenos específicos (SPF) foram imunofenotipadas através de citometria de fluxo, de modo a poder compreender a dinâmica dos parâmetros estudados em relação à idade dos animais. Foram usadas aves SPF para que o desafio ambiental não representasse um viés nos resultados. Bridle e colaboradores (2006) realizaram um estudo em que também analisaram os parâmetros imunes de galinhas mantidas em condições comuns, de três diferentes faixas etárias. Entretanto, os autores discutem a necessidade de se estudar aves livres de fatores que poderiam trazer confusão na interpretação dos dados. Entre as três variáveis capazes de influenciar os resultados, genética, ambiente e vacinação, as duas últimas foram eliminadas no

presente estudo. O trabalho realizado por Bridle e colegas (2006) será diversas comparado aos valores obtidos no presente trabalho, e por isso seus resultados estão dispostos no Anexo 3. Aves de quatro idades diferentes foram utilizadas no presente experimento.

A ração dos três grupos etários mais velhos foi analisada para a presença de micotoxinas (análise feita por LAMIC – Universidade Federal de Santa Maria). Quantidades significativas de toxina zearalenona foram encontradas na ração desses grupos (respectivamente 221, 178 e 153µg/kg), sem traços de aflatoxina B1, aflatoxina B2, aflatoxina G1 e aflatoxina G2. É relevante conhecer o desafio por micotoxinas nas aves SPF, porque este é a única interferência a que estão sujeitas.

Os resultados aqui mostrados estão dispostos em tabelas e gráficos que se equivalem, diferindo apenas no modo de visualização dos dados. Como pode ser visto nos resultados, há um aumento relacionado à idade na proporção de linfócitos T auxiliares (marcação para CD4) em galinhas SPF, que é estatisticamente significativa entre os grupos ($P<0,0001$ entre neonatos e outros grupos, P ao menos = 0,01 entre juvenis 1 e juvenis 2 e adultos) até que foi atingido um platô entre juvenis 2 e adultos (FIGURA 8, TABELA 3). Bridle e colegas (2006) não puderam correlacionar as proporções de linfócitos auxiliares com o aumento da idade. Esses autores usaram aves com médias de idades similares àqueles usados no presente trabalho, embora as aves tenham sido mantidas em diferentes condições. Observaram uma redução dessas células em aves com uma idade intermediária.

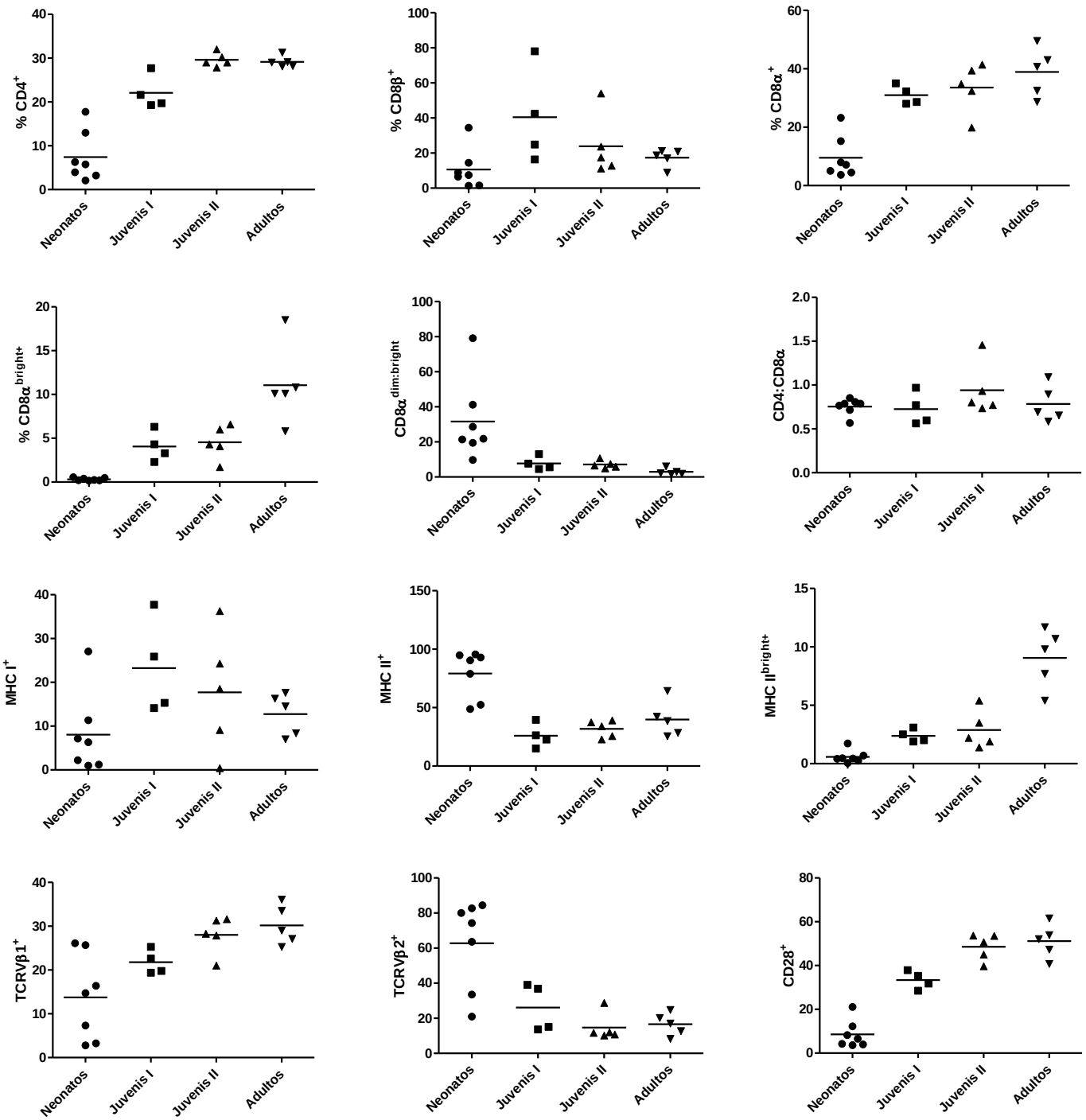
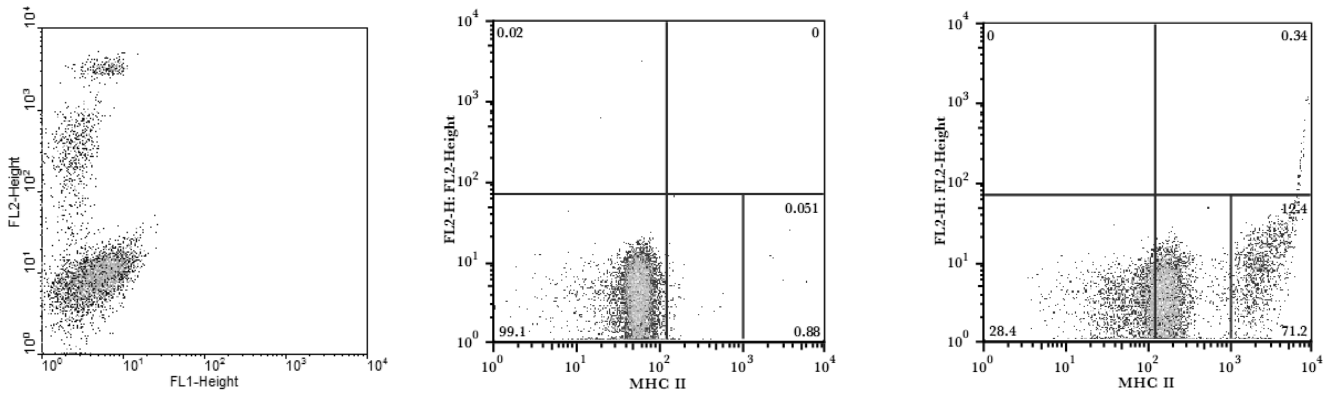


FIGURA 8 – RESULTADOS DAS IDADES DE AVES SPF.
GRÁFICOS DE DISPERSÃO ENTRE REPETIÇÕES E FREQÜÊNCIA DE CADA SUBPOPULAÇÃO DE LINFÓCITOS OU RAZÃO ENTRE FREQÜÊNCIAS, MOSTRADOS PARA CADA FAIXA ETÁRIA. EIXO Y MOSTRA A PORCENTAGEM DE CÉLULAS POSITIVAMENTE MARCADAS PARA CADA ANTICORPO OU RAZÃO ENTRE ELES (NOS CASOS DE $CD8A^{DIM+}$:$CD8A^{BRIGHT+}$ E $CD4^{+}$:$CD8A^{+}$).

Linfócitos T citotóxicos foram divididos em três diferentes subpopulações: CD8β^{+}, CD8α$^{bright+}$ e CD8α^{dim+}. Estas duas últimas representam uma subdivisão da população reconhecida pelo anticorpo CD8α, diferidas por diferentes emissões de fluorescência (BREED *et al.*, 1996).

A Figura 9A mostra um gráfico de densidade de células típico de citometria de fluxo da população CD8^{+}.



(A) (B) (C)

FIGURA 9 – POPULAÇÕES COM FLUORESCÊNCIA BRIGHT.
CITOMETRIA DE FLUXO TÍPICA DEMONSTRADA EM GRÁFICOS DE DENSIDADE DE EVENTOS MARCADOS PARA CD8A (A) E MHC II (C). AS SUBPOPULAÇÕES DE CD8A^{+} E MHC II^{+} EMITEM DIFERENTES NÍVEIS DE FLUORESCÊNCIA; (A) CD8A ASSOCIADO A PE – REPARAR NA POPULAÇÃO DE ALTA FLUORESCÊNCIA ENTRE 10^3 E 10^4; (B) ANTICORPO SECUNDÁRIO, CONTROLE (ANTI-CAMUNDONGO FITC) PARA MHC II; (C) MHC II; REPARAR NA POPULAÇÃO *BRIGHT*, SEPARADA DA POPULAÇÃO *DIM*, QUE ESTÁ ENTRE 10^2 E 10^3.

As células CD8^{+} também apresentaram padrão relacionado com a idade, mas de maneira diferenciada entre seus diferentes subgrupos (FIGURA 8, TABELA 3): CD8α$^{+bright}$ foi marcadamente aumentada em aves mais velhas (P ao menos = 0,008 entre adultos e todos os outros grupos) enquanto que neonatos tiveram a menor proporção de CD8α$^{+bright}$ (P=0,03 contra juvenis I, P=0,01 contra juvenis II e P<0,0001 contra adultos), como também foi observado para a população total de CD8α^{+} (CD8α^{dim+} mais CD8α$^{bright+}$) (P ao menos = 0,0002). Para o grupo CD8β^{+}, entretanto, o padrão não foi claro, já que a proporção de células positivas aumentou dos neonatos para os juvenis 1 (P=0,008), e deste ponto para frente, as proporções foram reduzidas para os níveis dos adultos na idade adulta. As aves mais jovens têm a razão aumentada de CD8α^{dim+}:CD8α$^{bright+}$ (P ao menos = 0,01) comparados a

todas as outras idades. Neste estudo, as tendências paralelas de células T auxiliares e T citotóxica ao longo das semanas manteve a razão entre essas subpopulações (CD4:CD8) estável durante o período.

A razão CD4:CD8 foi calculada para cada ave individualmente, e médias para cada grupo foram comparadas. Como citado, não houve diferenças estatísticas entre diferentes idades, e os valores oscilaram entre 0,725 a 0,94 (FIGURA 8, TABELA 3). A imunização parece aumentar a quantidade de linfócitos T circulantes (TIMMS e ALEXANDER, 1977), mas idades mais avançadas reportadamente têm uma proporção diferenciada dessas células, podendo variar entre razões menores de CD4:CD8 (PARMENTIER *et al.*, 1995) ou maiores (BRIDLE *et al.*, 2006).

Como é visto com as células CD8α^{+}, a expressão de MHC II na superfície celular é heterogênea em populações celulares diversas. Células apresentadoras de antígeno ativadas (APCs) e células dendríticas mostram maior quantidade dessas moléculas, sendo diferenciadas na citometria de fluxo por níveis mais altos de fluorescência do que o resto das células MHC II^{+}. A Figura 9 ilustra esse fato. Como pode ser visto na Tabela 3 e na Figura 8, neonatos tiveram uma maior porcentagem de células MHC II^{+} quando comparados com outras idades (P ao menos = 0,0004), mas interessantemente tinham um quantidade bastante diminuída de MHC II$^{bright+}$, que é claramente distinta do resto da população MHC II^{+} em todos os outros grupos (P ao menos = 0,01, exceto contra juvenis I). Esse subgrupo de células aumentou-se em dois passos, dos neonatos para os juvenis, e desses para os adultos, onde foi a mais alta. Para MHC I, a distribuição seguiu aquela de CD8β^{+}, ou seja, foi significativamente reduzido em aves de 1 dia de vida comparado com aves de 5 semanas (P=0,02), mas desse ponto para frente foi novamente reduzida. Assim, ambas as marcações seguem as mesmas tendências com o passar do tempo, e isso poderia indicar uma associação entre esses parâmetros. CD8β^{+} é responsável pela ligação com a molécula MHC I expressa nas células infectadas, e sua funcionalidade depende da interação entre ambas as moléculas (CHEROUTRE e LAMBOLEZ, 2008).

Linfócitos T aviários podem ser divididos em três subpopulações, de acordo com a expressão diferencial do receptor de linfócito T, que são TCR1 (ou TCRγδ), TCR2 (ou αβ Vβ1) e TCR3 (ou αβ Vβ2) (LAHTI *et al.*, 1991). TCR é a molécula reconhecedora de antígeno de células T, que se liga ao MHC de células apresentadoras de antígeno ou de células infectadas. O maior grupo de células T em

galinhas é composto do subgrupo αβ (SHARMA, 1990). Receptores de células T αβ (TCR) Vβ1 e Vβ2 foram usados para fenotipagem de aves no presente estudo, e mostraram distribuições opostas ao longo do desenvolvimento das aves. Enquanto Vβ1 foi reduzida nas aves mais jovens (neonatos) (P = 0,001), Vβ2 foi estatisticamente maior para as aves de 1 dia de vida contra os outros grupos (P ao menos = 0,003).

CD28 é um contra-receptor para a molécula B7, e é estimulado durante o contato do linfócito T e células apresentadoras de antígenos (LINSLEY e LEDBETTER, 1993). A proporção de células positivas para CD28 também foi claramente associada à progressão etária, e foi aumentada até atingir um platô no estágio de juvenil II e idades adultas. (FIGURA 8, TABELA 3) (P neonatos vs. outros < 0,0001; P juvenil I vs. II ou adultos ao menos = 0,002).

Moléculas de superfície	Neonatos (1 dia de vida)	Juvenil 1 (5 semanas de vida)	Juvenil 2 (12 semanas de vida)	Adulto (60 semanas de vida)
CD4	7,43 ± 5,77%^{c}	22,07 ± 3,88%^{b}	29,62 ± 1,56%^{a}	29,14 ± 1,29%^{a}
CD8α	9,52 ± 7,16%^{b}	30,97 ± 3,29%^{a}	33,58 ± 8,44%^{a}	38,90 ± 8,36%^{a}
CD8α^{Bright}	0,31 ± 0,15%^{c}	4,05 ± 1,71%^{b}	4,54 ± 1,92%^{b}	11,06 ± 4,61%^{a}
CD8α$^{Dim:Bright}$	31,6 ±23,04%^{a}	7,69 ± 3,8%^{b}	7,12 ± 2,20%^{b}	2,95 ± 1,79%^{b}
CD4:CD8α	0,75 ± 0,93%	0,72 ± 0,19%	0,94 ± 0,3%	0,78 ± 0,21%
CD8β	10,45 ± 11,4%^{ab}	40,42 ±27,29%^{a}	23,84 ± 17,55%^{ab}	17,34 ± 5,02%^{ab}
MHC I	8,04 ± 9,18%^{ab}	23,25 ±11,00%^{a}	17,72 ± 13,81%^{ab}	12,76 ± 4,77%^{ab}
MHC II	79,14±20,27%^{a}	25,90 ±10,20%^{b}	31,82 ± 7,21%^{b}	39,84 ± 15,33%^{b}
MHC II^{Bright}	0,58 ± 0,54%^{b}	2,37 ± 0,55%^{ab}	2,88 ± 1,61%^{ab}	9,06 ± 2,52%^{a}
TCR αβ Vβ1	13,75 ± 9,78%^{b}	21,775 ±2,75%^{ab}	28,02 ± 4,27%^{a}	30,20 ± 4,49%^{a}
TCR αβ Vβ2	62,81±25,51%^{a}	26,15 ±13,66%^{b}	14,70 ± 7,91%^{b}	16,60 ± 6,41%^{b}
CD28	8,56 ± 6,32%^{c}	33,37 ± 4,10%^{b}	48,54 ± 6,07%^{a}	51,14 ± 7,74%^{a}

TABELA 3 – PORCENTAGENS DE LINFÓCITOS NO SANGUE PERIFÉRICO DE GALINHAS SPF DE DIFERENTES IDADES.
OS RESULTADOS SÃO MOSTRADOS COMO MÉDIA ± SD. $^{A,\ AB,\ C}$ INDICAM DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (TESTE DE FISHER, P<0,05) ENTRE OS GRUPOS.

Dez aves com idades equiparáveis às três faixas etárias mais velhas (3 aves de 9 semanas, 3 aves de 14 semanas e 4 aves de 62 semanas) foram analisadas através de leucograma, para comparar a evolução total dos leucócitos ao longo das diferentes idades. O número de linfócitos permanece estável ao longo do

envelhecimento dos animais (TABELA 4), o que significa que os valores demonstrados pelas percentagens acima provavelmente permaneceriam estáveis quando vistos sob o ângulo do número total de células de cada subtipo por microlitro de sangue (este número é obtido multiplicando-se as porcentagens da tabela 3 pelo número de linfócitos no sangue, na Tabela 4). O número de heterófilos, no entanto, aumentou nos animais com 62 semanas de vida, o que significa que a relação H:L também aumentou (TABELA 4). Valores de referência para o leucograma estão no anexo 4.

	9 semanas	**14 semanas**	**62 semanas**
Leucócitos	6500,00 ± 2920,62	8333,33 ± 1700,98	8875,00 ± 2658,79
Heterófilos	1197,33 ± 712,05[b]	1324,67 ± 632,85[b]	3174,00 ± 1234,86[a]
Linfócitos	4697,00 ± 1964,40	6458,67 ± 1114,50	4702,50 ± 1611,97
H:L	0,25 ± 0,07[b]	0,20 ± 0,08[b]	0,70 ± 0,25[a]
Monócitos	307,67 ± 322,05	133,33 ± 34,02	669,00 ± 571,86
Eosinófilos	33,00 ± 30,81	161,33 ± 80,13	149,50 ± 130,73
Basófilos	265,00 ± 105,48	255,33 ± 126,18	180,00 ± 123,56

TABELA 4 – LEUCOGRAMA DE AVES SPF, EM TRÊS FAIXAS ETÁRIAS.
VALORES SÃO DADOS EM NÚMERO DE CÉLULAS POR MICROLITRO DE SANGUE PERIFÉRICO. OS RESULTADOS SÃO MOSTRADOS COMO MÉDIA ± SD OU COMO A RAZÃO ENTRE NÚMERO DE HETERÓFILOS E LINFÓCITOS (H:L) ± SD. [A, B] INDICAM DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (TESTE DE FISHER, $P<0.05$) ENTRE OS GRUPOS.

4.3 AVES COMUNS VS. AVES SPF

Aves de idades pareadas, entre 1 dia de vida e 60 semanas, mantidas sob diferentes condições, foram comparadas através de imunofenotipagem por citometria de fluxo com o objetivo de se compreender a importância que o ambiente poderia ter nas aves experimentais. Foram utilizados os dados de até 21 aves SPF e 27 aves comuns. Os resultados obtidos (TABELA 5) evidenciaram que as aves SPF apresentam uma proporção estatisticamente relevante reduzida de células da subpopulação de TCRVβ1, de células de CD4 e da relação CD4:CD8. Entretanto, tem porcentagens maiores de CD8β, MHC I, MHC II e TCRVβ2 (Tabela 5).

É descrito que a colonização normal do intestino por microorganismos é importante para o desenvolvimento normal do sistema imune humoral e celular das mucosas, o que acontece durante a vida do neonato (CEBRA, 1999; KANEKO *et al.*, 2004). Pode-se supor que esta seja a razão das diferenças entre os dois grupos de aves comparados. As aves SPF demonstram um imunofenótipo de incompetência imunológica (razão CD4:CD8 baixa), com pouca presença de células TCRVβ1^{+}, que têm função importante na proteção das mucosas (CIHAK *et al.*, 1991; BRIDLE *et al.*, 2006).

Molécula de Superfície	Aves Comuns (%)	Aves SPF (%)	Valor de P
CD4	28, 13 ± 8,4	20,67 ± 10,62	0,01
CD8α	26,34 ± 13,39	26,33 ±14,18	0,10
CD8α^{bright}	3,62 ± 2,58	6,73 ± 4,43	0,13
CD8α$^{Dim:Bright}$	8,36 **±** 3,27	5,79 **±** 3,27	0,15
CD4:CD8α	1,23 ± 0,43	0,8 ± 0,2	0,0001
CD8β	10,06 ± 5,37	21,05 ± 18,32	0,007
MHC I	1,16 ± 0,84	17,53 ± 10,60	0,002
MHC II	7,78 ± 4,05	48,37 ± 26,74	< 0,0001
TCR αβ Vβ1	31,73 ± 12,39	22,59 ± 9,32	0,008
TCR αβ Vβ2	10,02 ± 3,98	33,37 ± 26,74	< 0,0001
CD28	36,32 ± 13,06	32,94 ± 19,63	0,50

TABELA 5 – COMPARAÇÃO ENTRE AVES COMUNS E AVES MANTIDAS SOB CONDIÇÕES SPF. OS RESULTADOS SÃO MOSTRADOS COMO MÉDIA ± SD.

4.4 AVES EM CONDIÇÃO SPF SOB DESAFIO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL

O terceiro passo na elucidação de quais parâmetros citométricos têm importância para a avicultura industrial consistiu em realizar desafios experimentais em aves mantidas sob condições SPF. As infecções em questão são: Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (IBV), Vírus da Doença de Gumboro (Infectious bursal disease virus – IBDV), *Eimeria* spp., agente causador de coccidiose e *Salmonella* sorovar Enterica. Grupos com 10 aves cada, mantidos em isoladores estéreis, foram inoculados com um agente conhecido diferente para cada grupo e comparados com um grupo controle o qual não recebeu qualquer desafio microbiano. A coleta de sangue e avaliação por citometria de fluxo ocorreu após sete

dias do desafio com os agentes infecciosos. Neste experimento, foram utilizadas outras duplas marcações, que facilitassem o delineamento de uma subpopulação, assim como utilizado na marcação de células com CD8α e CD28. As marcações realizadas foram CD8α/CD28,CD4/CD8α, CD8α/TCRVβ1, CD8α/CD8β, MHC I, MHC II e TCRVβ2.

O objetivo deste experimento foi verificar a consistência dos parâmetros em diferentes situações de desafio. Pretendia-se compreender as tendências esperadas para cada parâmetro dentro dos desafios realizados, para que em situações de avaliação imune de aves não-experimentais seja possível traduzir os desvios da normalidade de modo a explicar alterações zootécnicas que tenham sido observadas, por exemplo, ou, ao contrário, tentar predizer o impacto de tal alteração no lote de animais com base no que foi constatado na experimentação. Dentre os grupos infectados, apenas naquele que recebeu vírus da doença de Gumboro houve morte de animais (dois animais).

Os valores absolutos (Tabela 8) para os parâmetros foram obtidos multiplicando a porcentagem (Tabela 6) pela quantidade absoluta de linfócitos por microlitro (TABELA 7).

Para a marcação CD8α/CD4 (porcentagem) apenas foi verificada variação significativa entre os grupos quando se avaliou as células duplo-marcadas ($CD8\alpha^{+}CD4^{+}$) (FIGURA 13). Para esse grupo, as aves infectadas por IBDV apresentaram redução na proporção circulante em relação ao grupo controle (P=0,003). Os grupos infectados por IBV e *Salmonella* apresentam forte tendência a diminuição dessa marcação em relação ao controle. Quando se considera a quantidade absoluta de células por microlitro, estes grupos passam a apresentar diferença significativa. Na marcação das células $CD8\alpha^{-}CD4^{+}$ os grupos infectados por IBV e *Salmonella* são diferentes dos animais hígidos.

A relação CD4:CD8 manteve-se estável entre todos os grupos considerados. Contudo, observou-se uma tendência de redução dessa proporção no grupo infectado por *Salmonella* em relação ao controle.

Os grupos infectados por IBV, *Salmonella* e IBDV apresentaram proporções maiores de células $CD8\alpha^{+}CD28^{-}$ em relação ao controle (FIGURA 10, TABELA 6). Na contagem absoluta (TABELA 8), apenas os dois últimos grupos são superiores ao grupo não infectado. O grupo de células virgens ou naïve ($CD8\alpha^{+}CD28^{+}$) foi reduzido para estes dois últimos grupos em relação ao controle na contagem percentual, mas

os três grupos, IBV, *Salmonella* e IBDV, são inferiores ao controle na contagem absoluta de células $CD8\alpha^{+}CD28^{+}$. Apenas o grupo de IBDV foi reduzido em relação ao controle na porcentagem de $CD8\alpha^{-}CD28^{+}$, mas IBDV e *Salmonella* o foram na contagem absoluta dessas células.

Todos os grupos de infecção foram inferiores ao controle na marcação de percentual de células $CD8\alpha^{+}CD8\beta^{-}$ (ou seja, células CD8αα). A marcação de $CD8\alpha^{+}CD8\beta^{+}$ foi irregular, sem diferenças para o grupo saudável (TABELA 6). O perfil manteve-se para a contagem absoluta de células para ambas as situações (TABELA 8).

As células $CD8\alpha^{+}TCRV\beta1^{+}$ apresentaram redução significativa em relação ao controle apenas no grupo de doença de Gumboro (infectado por IBDV). Esse grupo também foi o único a ter menores proporções para $CD8\alpha^{-}TCRV\beta1^{+}$ (TABELA 6). Ao analisar a quantidade absoluta (TABELA 8), entretanto, apenas *Eimeria* não ficou reduzida para $CD8\alpha^{+}TCRV\beta1^{+}$ e ambas as infecções virais (IBV e IBDV) foram menores que o controle em $CD8\alpha^{-}TCRV\beta1^{+}$ absolutos. Esta subpopulação é provavelmente $CD4^{+}$ em sua grande maioria, de acordo com Berndt e colaboradores (2006). A população $CD8\alpha^{+}TCRV\beta1^{-}$ é muito menor do que as duas anteriores, de no máximo 11,7% (TABELA 6), e não apresentou padrões definidos e diferenças em relação ao controle quando se consideram as porcentagens ou o valor absoluto (TABELA 8).

As células $TCRV\beta2^{+}$ apresentaram-se estatisticamente reduzidas em porcentagens de células nos grupos infectados por Salmonella e IBDV em relação ao controle, e apresentou tendência de redução no grupo infectado por IBV (TABELA 6). Ao considerar a quantidade total, todos os grupos foram menores do que o controle (TABELA 8).

Marcação por MHC I foi irregular, com grandes desvios padrão, e nenhum grupo foi diferenciado.

As células MHC II^{+} também foram iguais entre os grupos. Entretanto, as células MHC $II^{bright+}$ foram reduzidas no grupo infectado por IBV em relação ao grupo não infectado tanto na porcentagem circulante (TABELA 6) quanto na quantidade absoluta de células (TABELA 8). *Salmonella* foi menor que o controle apenas na quantidade absoluta.

Moléculas de Superfície	Controle	Eimeria (%)	Valor de P	IBV (%)	Valor de P	Salmonella (%)	Valor de P	IBDV (%)	Valor de P
$CD8\alpha^{+}CD4^{-}$	9,91 ± 6,09	10,15 ± 4,64	0,90	10,23 ± 3,42	0,87	7,99 ± 2,79	0,33	10,25 ± 3,60	0,86
$CD8\alpha^{+}CD4^{+}$	34,73± 18,20	28,16 ± 8,16	0,20	25,32 ± 10,51	0,08	24,27 ± 10,14	0,05	18,46 ± 5,43	0,003
$CD8\alpha^{-}CD4^{+}$	26,29 ± 11,94	23,25 ± 8,72	0,42	23,47 ± 9,49	0,47	19,87 ± 4,75	0,10	24,62 ± 5,00	0,67
CD4:CD8α	1,63 ± 0,63	1,38 ± 0,32	0,78	1,56 ± 0,54	0,98	1,34 ± 0,22	0,95	1,55 ± 0,43	0,31
$CD8\alpha^{+}CD28^{-}$	5,24 ± 3,27	7,29 ± 3.86	0,29	9,16 ± 5,29	0,04	12,87 ± 3,63	0,0001	15,13 ± 4,62	<0,0001
$CD8\alpha^{+}CD28^{+}$	34,40 ± 18,69	30,76 ± 12,14	0,53	26,76 ± 10,41	0,17	23,11 ± 10,02	0,04	15,17 ± 5,28	0,0009
$CD8\alpha^{-}CD28^{+}$	24,10 ± 9,93	24,51 ± 8,82	0,91	23,71 ± 7,34	0,91	18,46 ± 5,58	0,10	15,04 ± 5,98	0,01
$CD8\alpha^{+}TCRV\beta1^{-}$	8,57 ± 4,27	6,48 ± 1,42	0,28	10,43 ± 5,22	0,33	8,79 ± 5,54	0,90	11,68 ± 3,06	0,10
$CD8\alpha^{+}TCRV\beta1^{+}$	34,02 ± 15,51	32,70 ± 10,98	0,80	26,33 ± 8,82	0,16	30,55 ± 14,21	0,51	17,00 ± 7,33	0,002
$CD8\alpha^{-}TCRV\beta1^{+}$	23,51 ± 8,54	22,5 ± 4,70	0,75	22,49 ± 6,90	0,75	24,94 ± 9,48	0,65	16,97 ± 4,09	0,04
$CD8\alpha^{+}CD8\beta^{-}$	45,02 ± 17,39	29,14 ± 7,34	0,003	29,98 ± 11,38	0,005	24,7 ± 9,52	0,0002	24,17 ± 6,06	0,0001
$CD8\alpha^{+}CD8\beta^{+}$	3,03 ± 2,67	6,68 ± 10,18	0,20	2,62 ± 2,27	0,89	5,96 ± 8,55	0,29	1,78 ± 1,66	0,65
TCRVβ2	92,56 ± 5,94	91,08 ± 2,93	0,51	88,0 ± 5,56	0,07	86,84 ± 5,78	0,01	87,52 ± 5,25	0,03
MHC I	22,15 ± 26,12	23,10 ± 15,76	0,91	10,88 ± 10,38	0,21	26,46 ± 29,09	0,62	7,95 ± 3,75	0,11
MHC II	18,52 ± 6,27	23,88 ± 5,97	0,15	18,94 ± 9,6	0,91	23,72 ± 13,72	0,16	18,77 ± 2,75	0,94
$MHC\ II^{bright}$	10,99 ± 4,53	12,65 ± 4,55	0,37	5,52 ± 1,73	0,005	8,75 ± 4,62	0,22	12,51 ± 4,49	0,41

TABELA 6 – COMPARAÇÃO ENTRE AVES MANTIDAS SOB CONDIÇÕES SPF SOB DIFERENTES DESAFIOS, PORCENTAGENS DE CÉLULAS CIRCULANTES.

OS RESULTADOS SÃO MOSTRADOS COMO MÉDIA ± SD. VALOR DE P DETERMINADO EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE

	Controle	Eimeria (céls/µl)	Valor de P	IBV	Valor de P	Salmonella	Valor de P	IBDV	Valor de P
Leucócitos	5225 ± 411,30	4950 ± 472,58	0,59	5220 ± 704,98	0,99	4560 ± 944,99	0,18	5160 ± 743,64	0,89
Heterófilos	1388,25 ± 227,16	1437,00 ± 586,62	0,92	2164,20 ± 1087,41	0,11	1717,60 ± 603,78	0,49	1463,60 ± 576,01	0,87
Linfócitos	3435,75 ± 260,88	3071,25 ± 918,88	0,50	2598,20 ± 953,55	0,11	2518,80 ± 624,32	0,09	3316,00 ± 762,44	0,81
H:L	0,41 ± 0,08[b]	0,53 ± 0,31[ab]	0,66	1,00 ± 0,70	0,04	0,72 ± 0,31	0,26	0,47 ± 0,24	0,82
Monócitos	121,00 ± 111,07	23,00 ± 26,67	0,12	95,20 ± 139,80	0,65	11,20 ± 25,04	0,07	40,20 ± 44,10	0,17
Eosinófilos	81,25 ± 69,70	142,00 ± 88,70	0,47	161,80 ± 160,07	0,32	140,80 ± 98,48	0,46	158,20 ± 132,95	0,34
Basófilos	198,75 ± 89,70	276,75 ± 144,99	0,44	200,60 ± 118,85	0,98	171,60 ± 106,10	0,77	182,00 ± 202,41	0,86

TABELA 7 – LEUCOGRAMA DE AVES SPF INFECTADAS POR DIFERENTES AGENTES.

VALORES SÃO DADOS EM NÚMERO DE CÉLULAS POR MICROLITRO DE SANGUE PERIFÉRICO. OS RESULTADOS SÃO MOSTRADOS COMO MÉDIA ± SD OU COMO A RAZÃO ENTRE NÚMERO DE HETERÓFILOS E LINFÓCITOS (H:L) ± SD. VALOR DE P DETERMINADO EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE.

Moléculas de Superfície	Controle	Eimeria	Valor de P	IBV	Valor de P	Salmonella	Valor de P	IBDV	Valor de P
$CD8\alpha^{+}CD4^{-}$	340,58 ± 209,31	311,70 ± 142,46	0,70	240,32 ± 116,30	0,18	259,71 ± 196,40	0,28	305,93 ± 155,70	0,64
$CD8\alpha^{+}CD4^{+}$	1193,37 ± 625,37	864,86 ± 250,67	0,06	593,56 ± 328,24	0,0009	550,26 ± 308,40	0,0004	551,05 ± 257,47	0,0004
$CD8\alpha^{-}CD4^{+}$	903,29 ± 410,14	714,07 ± 267,86	0,16	550,92 ± 297,91	0,01	451,09 ± 192,65	0,001	734,83 ± 301,96	0,21
CD4:CD8α	1,63 ± 0,63	1,38 ± 0,32	0,24	1,56 ± 0,54	0,70	1,34 ± 0,22	0,06	1,55 ± 0,43	0,69
$CD8\alpha^{+}CD28^{-}$	180,16 ± 112,22	196,30 ± 126,27	0,77	214,74 ± 149,28	0,54	324,22 ± 91,51	0,01	501,74 ± 153,29	<0,0001
$CD8\alpha^{+}CD28^{+}$	1181,93 ± 642,12	859,47 ± 443,97	0,08	626,00 ± 336,02	0,003	582,09 ± 252,36	0,002	503,04 ± 175,23	0,0004
$CD8\alpha^{-}CD28^{+}$	828,02 ± 341,24	835,56 ± 554,86	0,96	556,04 ± 261,47	0,07	465,07 ± 140,45	0,02	498,79 ± 198,39	0,03
$CD8\alpha^{+}TCRV\beta1^{-}$	294,32 ± 146,57	191,58 ± 47,63	0,06	245,55 ± 150,99	0,37	221,36 ± 139,53	0,18	387,31 ± 101,64	0,09
$CD8\alpha^{+}TCRV\beta1^{+}$	1169,03 ± 533,01	1015,05 ± 319,64	0,34	618,24 ± 300,29	0,001	769, 49 ± 358,02	0,02	563,98 ± 243,16	0,0005
$CD8\alpha^{-}TCRV\beta1^{+}$	807,71 ± 293,38	667,38 ± 155,25	0,15	538,09 ± 223,47	0,007	628,19 ± 238,81	0,07	562,82 ± 135,59	0,01
$CD8\alpha^{+}CD8\beta^{-}$	1546,64 ± 597,41	831,36 ± 293,02	<0,0001	705,05 ± 363,73	<0,0001	622,14 ± 239,71	<0,0001	801,48 ± 201,09	<0,0001
$CD8\alpha^{+}CD8\beta^{+}$	104,06 ± 91,82	255,34 ± 334,72	0,07	62,46 ± 57,42	0,62	150,04 ± 215,50	0,58	59,10 ± 55,20	0,59
TCRVβ2	3180,25 ± 203,97	2797,29 ± 90,03	0,0005	2147,84 ± 437,12	<0,0001	2187,33 ± 145,55	<0,0001	2902,16 ± 174,18	0,009
MHC I	760,14 ± 897,39	709,49 ± 484,02	0,84	255,77 ± 267,98	0,05	666,37 ± 732,70	0,71	263,69 ± 124,37	0,06
MHC II	636,21 ± 215,47	733,41 ± 183,40	0,35	446,79 ± 275,28	0,07	597,46 ± 345,51	0,71	622,41 ± 91,07	0,89
MHC II^{bright}	377,78 ± 155,63	388,54 ± 139,66	0,85	129,94 ± 59,93	<0,0001	220,45 ± 116,32	0,008	414,90 ± 148,86	0,51

TABELA 8 – COMPARAÇÃO ENTRE AVES MANTIDAS SOB CONDIÇÕES SPF E SUBMETIDAS A DIFERENTES DESAFIOS, EM VALORES ABSOLUTOS DE CÉLULAS CIRCULANTES (CÉLULAS/MICROLITRO DE SANGUE).

OS RESULTADOS SÃO MOSTRADOS COMO MÉDIA ± SD. $^{A, AB, B, C}$ INDICAM DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (TESTE DE FISHER, $P<0.05$) ENTRE OS GRUPOS.

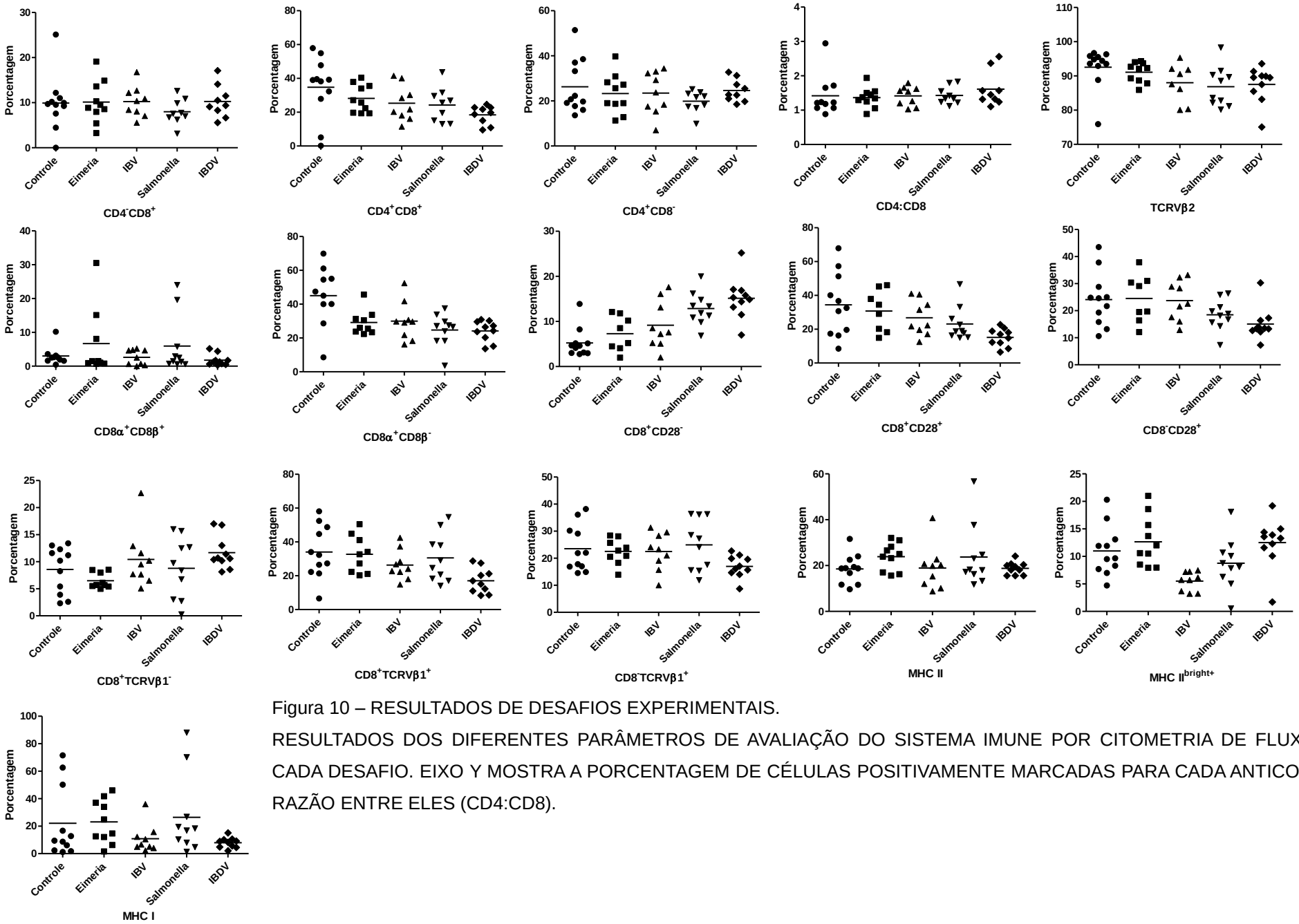
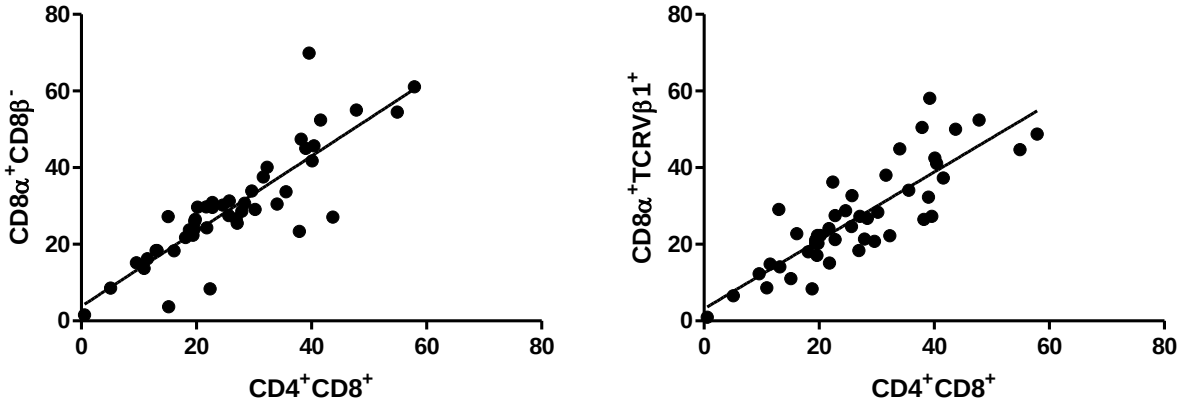


Figura 10 – RESULTADOS DE DESAFIOS EXPERIMENTAIS.

RESULTADOS DOS DIFERENTES PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DO SISTEMA IMUNE POR CITOMETRIA DE FLUXO PARA CADA DESAFIO. EIXO Y MOSTRA A PORCENTAGEM DE CÉLULAS POSITIVAMENTE MARCADAS PARA CADA ANTICORPO OU RAZÃO ENTRE ELES (CD4:CD8).

Os resultados obtidos com as diferentes infecções auxiliaram a demonstrar e esclarecer a função de alguns subgrupos, cuja importância é ainda debatida (LUHTALA *et al.*, 1997b; SULLIVAN *et al.*, 2001; SAALMULLER *et al.*, 2002). Através da avaliação da correlação entre diferentes marcações, torna-se evidente que as populações $CD4^+CD8\alpha^+$, cuja presença é variável na maioria dos mamíferos (ZUCKERMANN, 1999; SULLIVAN *et al.*, 2001), e $CD8\alpha^+CD8\beta^-$, equivalem-se em grande medida, confirmando dados da literatura (LUHTALA *et al.*, 1997a) (Figura 11). Estes parâmetros provavelmente indicam a mesma subpopulação de células, portanto. Assim, toda célula $CD4^+CD8^+$ será $CD8\alpha\alpha^+$, e será provavelmente portadora do TCRVβ1.



(A) (B)

FIGURA 11 – (A) REGRESSÃO ENTRE AS SUBPOPULAÇÕES $CD4^+CD8A^+$ E $CD8A^+CD8B^-$. COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO=0,861. (B) REGRESSÃO ENTRE AS SUBPOPULAÇÕES $CD8\alpha^+TCRVB1^+$ E $CD4^+CD8^+$. COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO = 0,843.

4.5 DESAFIO BRONQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS – PARCERIA UFPR/USP/INTERVET

Este experimento objetivou caracterizar o desenvolvimento da resposta imune ao longo de uma infecção experimental por uma cepa do vírus da Bronquite infecciosa cuja patogenicidade ainda não havia sido plenamente caracterizada. O vírus da Bronquite Infecciosa também foi utilizado na infecção de aves SPF, mas naquela situação apenas uma avaliação pontual do sistema imune foi realizada. Reportava-se que este era um vírus de patogenicidade elevada (comunicação

pessoal), aqui denominado *CGR33*, do vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (IBV). Este teste propôs-se a servir dois objetivos, que seriam caracterizar a patogenicidade do vírus e compreender o desenrolar da resposta imune vista ao decorrer da infecção.

Assim, vinte e três galos de vinte e três semanas de vida foram infectados com o vírus da Bronquite Infecciosa (IBV), cepa CRG33 (variante brasileira). Os linfócitos circulantes foram avaliados para diferentes marcadores após, 5, 10, 17, 30 e 45 dias pós-infecção. Os resultados encontrados na citometria de fluxo para esses parâmetros estão apresentados no Anexo 5 e na Figura 12.

Como pode ser visto, células $CD4^+$ apresentaram-se reduzidas no 5º dia de infecção (P=0,01) e houve um retorno à normalidade nos dias seguintes, com tendência de aumento acima do controle ao final do período avaliado (P=0,06) (ANEXO 5, FIGURA 12).

CD8α demonstrou um padrão similar à CD4, com redução relevante no dia 5 pós infecção (pi) (P=0,01), volta ao nível do controle no dia 10 pi e aumento no dia 17 pi (P=0,03). CD8β tem padrão irregular. Há redução significativa nos dias 5 e 10 (P=0,01 para ambos), um aumento sobre o controle no dia 17 pi (P=0,0007), novamente redução no dia 30 pi (P=0,03) e retorno aos níveis dos animais saudáveis no último dia de experimento (ANEXO 5, FIGURA 12).

Como as porcentagens de CD4 e CD8α seguiram os mesmos padrões, a relação CD4:CD8α manteve-se estável ao longo do experimento, embora tenha aproximado-se de uma queda no dia 17 pi (P=0,058).

O receptor de linfócitos T αβ Vβ1 foi reduzido nos dias 5 e 10 pi (P ao menos = 0,01), e retornou ao nível do controle nas coletas seguintes. O receptor TCRVβ2 também teve o mesmo perfil, diminuindo no dia 5 pi (P ao menos = 0,0001), retorna aos níveis do controle no dia 10 pi e sobrepuja os animais saudáveis nas medidas dos dias 17, 30 e 45 pi (p ao menos = 0,005) (ANEXO 5, FIGURA 12).

Níveis de MHC I foram instáveis ao longo do experimento, sendo reduzidos nos dias 5, 10 e 30 pi (P ao menos = 0,01). A porcentagem de células expressando MHC II na superfície foi reduzida nas primeiras duas medidas após a infecção (P ao menos = 0,002), sendo elevada no dia 17 pi (P=0,02) e diminuída novamente em relação ao controle no dia 30 pi (P=0,0007), estabilizando no nível do controle no dia 45 pi. Quantidade de MHC II^{bright} manteve-se nos níveis do controle até o dia 17,

quando começou a declinar até uma diferença estatística em 45 pi (P=0,03) (ANEXO 5, FIGURA 12).

O receptor coestimulatório CD28 igualmente reduziu-se nos dias 5 (P=0,02) e 10 pi (P<0,0001), para então elevar-se acima do nível do controle no dia 17 pi (P=0,004) e estabilizar-se em médias similares aos animais saudáveis em 30 e 45 pi.

A marcação dupla CD8α+CD28 só passou a ser realizada a partir do dia 17 pós infecção (FIGURA 13 e FIGURA 14). Neste dia, a quantidade de $CD8\alpha^{+}CD28^{-}$ foi aumentada em relação ao controle, porém sem significância estatística. No dia 30 pi, houve aumento relevante na proporção dessas células (P=0,005), que se ampliou no dia 45 pi (P<0,0001). A quantidade de células $CD8\alpha^{+}CD28^{-}$ permaneceu estável nas três datas em que foi avaliada, quando comparados ao controle. A tendência das células $CD8\alpha^{-}CD28^{+}$ foi uma redução progressiva a partir do dia 17 pi até o dia 45 pi (P=0,03 no dia 17 e P<0,0001 no dia 45) (FIGURA 14).

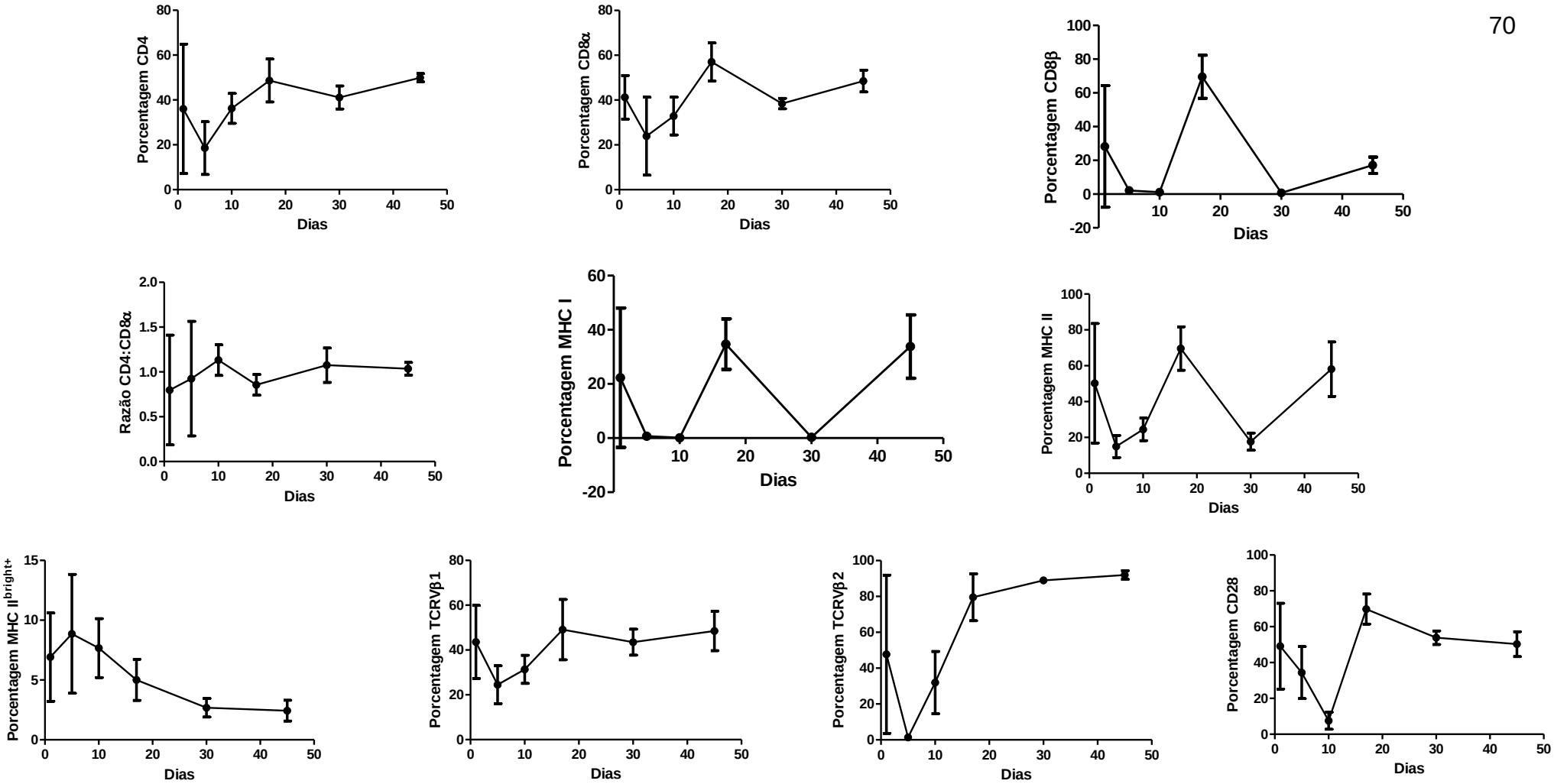


FIGURA 12 – RESULTADOS INFECÇÃO POR IBV EM GALOS.

RESULTADOS DA AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA POR CITOMETRIA DE FLUXO DAS AVES INFECTADAS PELO VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA (IBV), AO LONGO DE 45 DIAS. EIXO Y MOSTRA A PORCENTAGEM DE CÉLULAS POSITIVAMENTE MARCADAS PARA CADA ANTICORPO OU RAZÃO ENTRE ELES (NO CASO DE $CD4^{+}$:$CD8\alpha^{+}$).

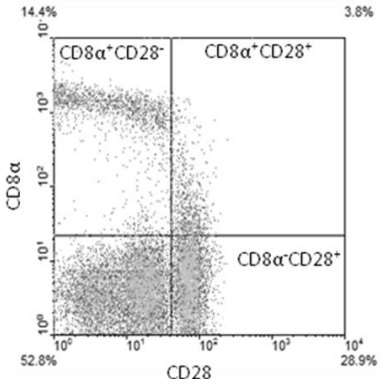
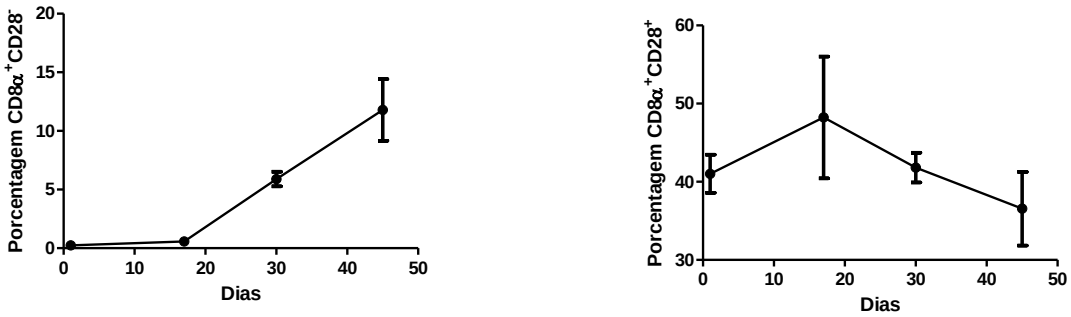


FIGURA 13 – EXEMPLO DE DUPLA MARCAÇÃO CD8A^{+}CD28^{-}.
NO QUADRANTE ESQUERDO SUPERIOR DO GRÁFICO DE DENSIDADE DE SUBPOPULAÇÕES, AS CÉLULAS CITOTÓXICAS EFETORAS. EIXO Y DO GRÁFICO DE BARRAS MOSTRA A PORCENTAGEM DE CÉLULAS POSITIVAMENTE MARCADAS PARA O ANTICORPO CD8α, MAS NEGATIVAMENTE MARCADA PARA CD28.



(A) (B)

FIGURA 14 – RESULTADOS MARCAÇÃO DE CÉLULAS CD8^{+}CD28^{-} (ATIVADAS)
(A) E CD8^{+}CD28^{+} (NAÏVE OU DE MEMÓRIA) (B) NOS DIAS 17, 30 E 45 PÓS-INFECÇÃO POR IBV. NO DIA 1, AVES CONTROLE. EIXO Y MOSTRA A PORCENTAGEM DE CÉLULAS POSITIVAMENTE MARCADAS PARA CADA ANTICORPO OU COMBINAÇÃO DESTES. *DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA EM TESTE DE FISCHER (P<0,05) EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE.

4.6 EFEITOS DOS PARÂMETROS IMUNES SOBRE A PRODUTIVIDADE E MECANISMOS DE AÇÃO DESTES PARÂMETROS

A importância da avaliação do sistema imune de frangos consiste na premissa, prevista na literatura, de que a intensa seleção de traços fenotípicos de produção, como ganho de peso ou produção de ovos, leva simultaneamente à seleção de animais cuja capacidade imunológica é debilitada (CHEESEMAN *et al.*, 2004). A proposição inversa também é verdadeira, e a seleção por algumas gerações de aves altamente responsivas imunologicamente cria animais mais limitados do ponto de vista produtivo (CHENG *et al.*, 2001).

Do mesmo modo, a avaliação imunológica das aves através da citometria de fluxo justifica-se se for levado em consideração as conseqüências que as alterações imunológicas podem ter para a produtividade dos animais, seja de forma direta ou indireta. Para verificar se algum dos parâmetros considerados neste trabalho tem qualquer influência direta sobre a capacidade produtiva de frangos de corte, vinte e cinco aves (galos e galinhas) foram alojadas em instalação regular da Universidade Federal do Paraná ao 1º dia de vida, permanecendo até o 45º dia. Semanalmente o sangue periférico dos animais foi coletado e a avaliação citométrica dos compartimentos imunológicos em repouso (sem desafios) foi avaliada. Esses dados foram então correlacionados com a capacidade zootécnica de cada animal.

O ganho de peso diário foi normalizado para a média de peso semanal (Material e Métodos, item 3.7.6), para permitir comparação direta entre todas as coletas. Esta normalização mantém os GDPs como flutuações ao redor do valor 1. Um GDP de 1 indica que o GDP daquele animal foi exatamente igual à média da semana entre todos os animais. Um valor maior que 1 indica que ele superou a média semanal (FIGURA 15).

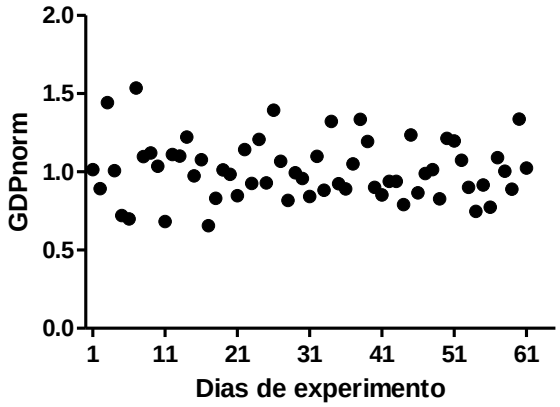


FIGURA 15 – $GDP_{NORMALIZADO}$.
A NORMALIZAÇÃO É EFICAZ, POIS O VALOR MANTÉM-SE CONSTANTE AO LONGO DE TODO O EXPERIMENTO.

Uma segunda normalização do ganho de peso foi feita. O GDP de cada animal foi dividido pelo seu peso ao final da semana. O objetivo é comparar a capacidade de GDP ao longo do tempo. O ganho de peso aumenta em valores absolutos à medida que o animal está maior, mas em valores relativos o GDP decresce (FIGURA 16). Essa normalização confere uma ideia mais próxima dos valores absolutos de GDP, uma vez que a média não se mantém estável ao longo das semanas do experimento.

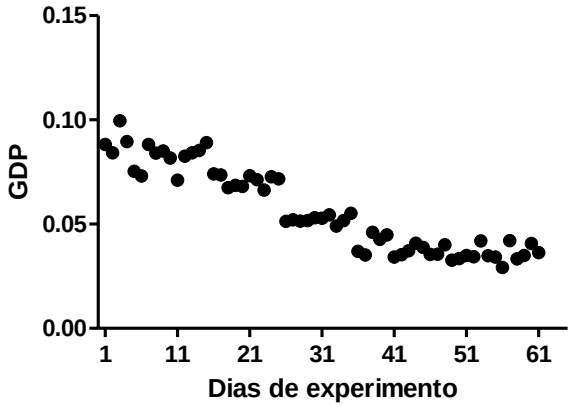


FIGURA 16 – GDP ABSOLUTO.
O VALOR É MAIOR NOS PRIMEIROS DIAS, QUANDO O CRESCIMENTO É MAIS VIGOROSO.

As marcações realizadas foram: Linfócitos B (Bu1), CD4/TCRVβ1, CD8α/CD28, CD8α/CD8β, MHC I, Macrófago (KUL01)/MHC II, TCRVβ2.

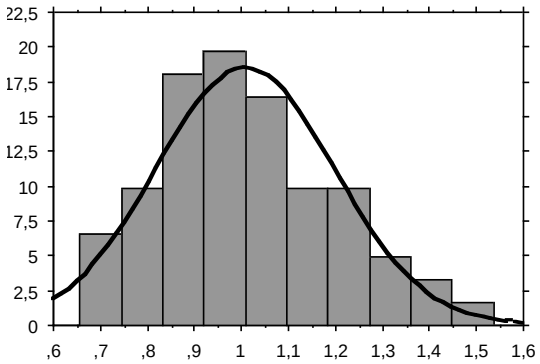
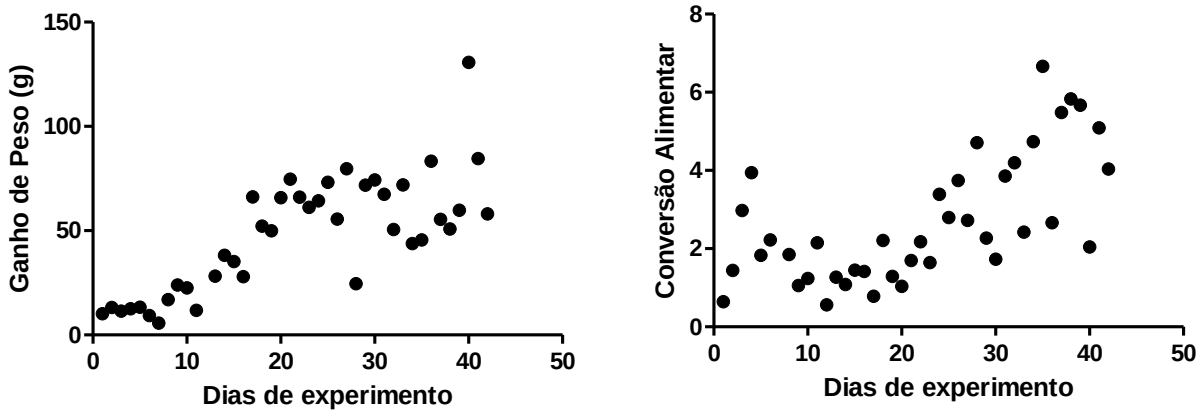


FIGURA 17 – DISTRIBUIÇÃO DO GDP.
VARIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DO GANHO DE PESO NORMALIZADO (DIVIDIDO PELA MÉDIA DE PESO NO PERÍODO) DOS ANIMAIS UTILIZADOS NO EXPERIMENTO, AO LONGO DAS SETE SEMANAS. O EIXO X MOSTRA OS GDP NORMALIZADOS. O EIXO Y MOSTRA A FREQÜÊNCIA, POR PORCENTAGEM, DA DISTRIBUIÇÃO ENTRE OS DIFERENTES GDP.

A Figura 18A mostra que o GDP seguiu o padrão comum observado em granjas comerciais, com alta produtividade até cerca do dia 20, quando o GDP é exponencial, e atinge um platô de GDP lento até o dia 45. A conversão alimentar (Figura 18B) atinge seu nível mais baixo também entre os dias 10 e 20 (uma CA baixa indica necessidade de pouco consumo para ganhar 1 quilograma de peso). Portanto, o experimento foi capaz de reproduzir esses efeitos da produtividade, o que é um indicativo da validade dos resultados e a possibilidade da sua extrapolação para granjas comerciais (FIGURA 18).



(A) (B)

FIGURA 18 – GDP E CA.
(A) MÉDIA DIÁRIA DE GANHO DE PESO (GDP) (EM GRAMAS) AO LONGO DOS 45 DIAS DE EXPERIMENTO. EIXO X, GDP EM GRAMAS, MÉDIA DE 1 DIA DO EXPERIMENTO. EIXO Y, DIAS DECORRIDOS DO EXPERIMENTO. (B) MÉDIA DIÁRIA DE CONVERSÃO ALIMENTAR (CA). COMO A CA FOI CALCULADA COMO UMA MÉDIA DA RAÇÃO CONSUMIDA ENTRE TODOS OS ANIMAIS (E NÃO COM A RAÇÃO CONSUMIDA POR CADA ANIMAL INDIVIDUALMENTE, É COMUM A OCORRÊNCIA DE CA<1 (VER MATERIAIS E MÉTODOS).

Métodos diversos para a avaliação do sistema imune de aves têm sido usados sistematicamente, e foram utilizados no presente trabalho de forma a embasar as interpretações obtidas com a contagem de subpopulações de células no citômetro de fluxo. Assim, foi possível correlacionar os parâmetros de contagens de subtipos células imunes no citômetro com outras medidas de resposta imunológica, as quais já têm significado estabelecido na literatura. Isso permitirá entender como as respostas imunológicas influenciam na capacidade zootécnica do animal, e quais alterações ocorrem exatamente quando uma subpopulação celular está aumentada ou diminuída na circulação. Entre esses métodos, está a aferição do tamanho da Bursa de Fabrícius bem como a relação bursa:massa corporal. Este é o órgão linfóide primário das aves responsável pela maturação dos linfócitos B. O tamanho da Bursa tem sido correlacionado com a capacidade imune do animal, por ser um órgão que reflete diretamente em sua morfologia a necessidade e a capacidade do animal de ativar sua resposta imune. Ao contrário da medula óssea, que tem o mesmo papel em mamíferos, a Bursa está em direto contato com a mucosa

intestinal, e está livre no abdômen, podendo expandir-se com a proliferação de células em seu estroma sem qualquer restrição por alguma estrutura óssea. Já foi demonstrado, por exemplo, que o estresse afeta diretamente o tamanho da Bursa (HECKERT *et al.*, 2002). Outro teste imunológico afere a capacidade do plasma das aves em aglutinar hemácias de outras espécies (HECKERT *et al.*, 2002; MATSON *et al.*, 2005), o que está ligado à presença no plasma do que se chamam de *anticorpos naturais*, desenvolvidos sem especificidade a qualquer antígeno específico, e a capacidade destes em fixar o complemento. Estes anticorpos são aplicados em uma placa com eritrócitos de animais de outra espécie, em diluição seriada. Esses anticorpos comprovadamente são capazes de aglutinar as células vermelhas, e a fixação do sistema complemento as lisa. Este teste avalia a imunidade humoral inata dos animais, o que parece estar associado geneticamente com a capacidade imune adaptativa e com a capacidade de resistência a doenças (MATSON *et al.*, 2005).

A comparação dos dados de ganho de peso para cada animal individualmente, em relação a alguns de seus parâmetros citométricos demonstra uma correlação considerada fraca/intermediária e negativa, quando considerada isoladamente (dados não mostrados). Entretanto, quando foram associados dois parâmetros citométricos que separadamente correlacionavam-se fracamente com o ganho de peso, foi possível evidenciar a ligação com esse parâmetro zootécnico (FIGURA 19). Foram comparados os animais organizados pela porcentagem de $CD4^{+}TCRVB1^{+}$ circulantes (separados entre os animais com as porcentagens 50% maiores e as 50% menores), e comparados em relação aos seus GDP/média no período (GDP_{norm}). Há uma tendência de que os animais com menos dessas células tenham um maior ganho de peso, mas sem significância estatística (P=0,08 e 0,3 respectivamente) (Figura 19A e B). Quando se selecionam os 25% maiores e menores em ambos os grupos as diferenças são estatisticamente significantes para $CD4^{+}TCRVB1^{+}$ (P=0,04) e CD4:CD8 (P=0,04) (Figura 19C e D). Quando se isolam os animais que têm simultaneamente valores baixos (50% menores) para ambos os parâmetros, estes possuem GDP significativamente maiores (0,02) (Figura 19E). Quando se faz esta combinação de parâmetros aleatória (entre outros parâmetros que não CD4:CD8 e $CD4^{+}TCRVB1^{+}$), no exemplo $CD8^{+}CD28^{-}$ e $CD4^{+}TCRVB1^{+}$, não se evidencia qualquer tendência em relação aos GDP (p=0,79) (Figura 19F). O mesmo ocorre com outros parâmetros considerados isoladamente, como $CD8^{+}CD28^{-}$ (Figura 19G). A contagem absoluta de linfócitos e a razão entre

heterófilos (heterófilos são os correspondentes, em aves, aos neutrófilos em mamíferos) e linfócitos (denominada H:L) foram dois parâmetros capazes de se correlacionar também com o ganho de peso, mas as técnicas utilizadas para quantificá-los são independentes da citometria de fluxo. Quando se associam os parâmetros medidos por citometria da razão CD4:CD8 com os linfócitos $CD4^{+}TCRVb1^{+}$, entretanto, a capacidade de se prever o ganho de peso dos animais supera as outras aferições.

As medidas de risco são utilizadas, em epidemiologia, para representar quantitativamente a relação entre os eventos, de modo a poder caracterizar ou não uma relação causal entre dois fatores (PEREIRA, 2003).

Foi testado se os parâmetros imunológicos eram capazes de relacionar-se com a chance de um animal estar ou não dentro do grupo com GDP abaixo da média, o que é uma desvantagem produtiva. Para isso, foram utilizados os conceitos epidemiológicos de risco. Assim, a hipótese foi a de que animais mais desenvolvidos do ponto de vista de algum parâmetro imunológico teriam uma chance maior (um risco maior) de estar no grupo de animais cujo desempenho foi menor do que a média do grupo.

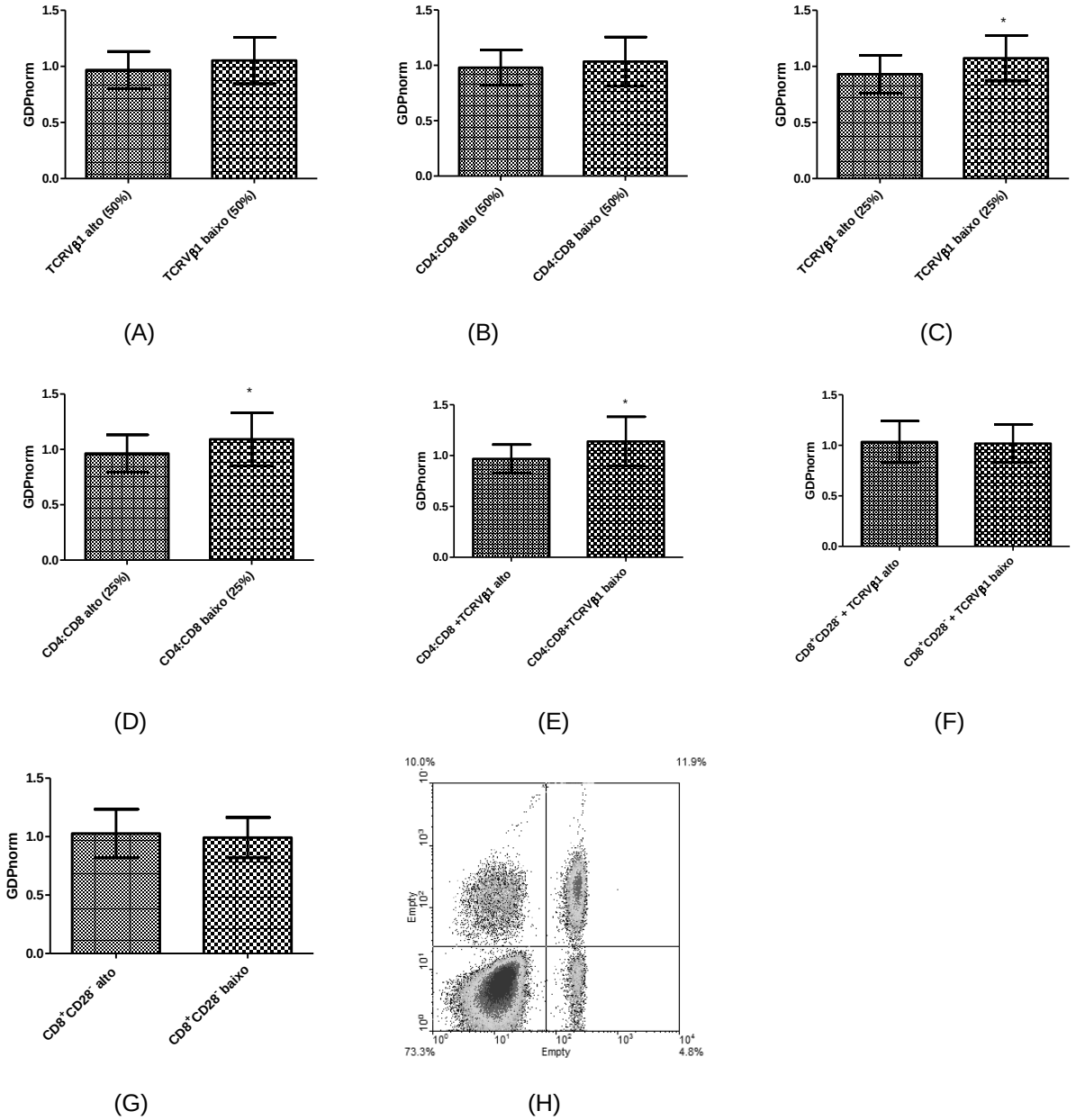


FIGURA 19 – CORRELAÇÃO ENTRE PARÂMETROS IMUNES E GDP.

COMPARADOS ANIMAIS POR $CD4^{+}TCRVB1^{+}$ (50%) (A) E DA RAZÃO CD4:CD8 (B) COMPARAÇÃO USANDO OS VALORES 25% MAIORES E MENOSRES PARA $CD4^{+}TCRVB1^{+}$ (C) E CD4:CD8 (D). AO CONSIDERAR $CD4^{+}TCRVB1^{+}$ E CD4:CD8 EM CONJUNTO, HÁ DIFERENÇA NO GDP DE AMBOS OS GRUPOS (E) SE A ASSOCIAÇÃO É ENTRE $CD4^{+}TCRVB1^{+}$ E $CD8^{+}CD28^{-}$, OS GDPs SÃO IGUAIS ENTRE OS GRUPOS (F). QUANDO O PARÂMETRO $CD8^{+}CD28^{-}$ É UTILIZADO ISOLADAMENTE, TAMBÉM NÃO DEMONSTRA TENDÊNCIA DE PREVER GDP (P=0,48) (G) EIXO Y MOSTRA O GDP_{NORM} EM CADA GRUPO, DIVIDOS COM BASE NOS PARÂMETROS ACIMA DESCRITOS. GRÁFICO DE DENSIDADE DE CÉLULAS PADRÃO DE DUPLA MARCAÇÃO CD4 E TCRVB1 (H). NO QUADRANTE SUPERIOR DIREITO, AS CÉLULAS $CD4^{+}TCRVB1^{+}$,*DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA EM TESTE DE FISHER (P<0,05) ENTRE OS GRUPOS.

O desempenho de cada animal foi calculado com base no seu ganho de peso (GDP). GDP é obtido pela equação do peso do dia X subtraído do peso do dia X-1. A conversão alimentar (CA) média é feita dividindo-se o consumo alimentar pelo ganho de peso no mesmo período.

Esse valor foi normalizado com relação ao peso médio do grupo dentro da semana considerada.

O valor de GDP_{norm} reflete o desempenho de um animal em relação ao grupo dentro da semana, sendo que será maior que 1 para os animais que tiveram GDP maior do que a média dentro da semana, e menor que 1 para os animais com GDP menor do que a média da semana. Analisou-se a chance de um animal estar abaixo da média do grupo, ou seja, com um GDP_{norm} abaixo de 1.

Os dados dos animais foram classificados em relação ao parâmetro CD4:CD8 e então os animais com essa razão baixa (entre os 50% menores) eram selecionados. O procedimento foi então repetido para a subpopulação de porcentagem de $CD4^{+}TCRV\beta1^{+}$. As aves que estivessem simultaneamente em ambos os grupos foram chamadas CD4:CD8 e $CD4^{+}TCRV\beta1^{+}$ “baixos”, e foram contados quantos animais estavam com seu GDP_{norm} abaixo de 1. Estes eram divididos pelo número total de aves no grupo que havia sido separado como “baixos” (considerando que a média varia a cada semana, todos os animais têm a possibilidade de estar acima ou abaixo dela na semana seguinte. Considerou-se portanto que este valor calculado equivaleria, para fins de medida de relação, à incidência). Esse era o risco do grupo imunologicamente deficiente de estar abaixo da média no GDP. Este valor foi comparado com o equivalente do grupo restante (ou seja, de proporções de CD4:CD8 e $CD4^{+}TCRV\beta1^{+}$ altas) (Tabela 9). O Risco Relativo (RR) medem a associação entre o fator de risco (sistema imune muito ativo) e a ocorrência (GDP_{norm} baixo). É um importante critério para julgar causalidade (PEREIRA, 2003).

Dessa forma, os dados obtidos na tabela 10 indicam que os animais com CD4:CD8 e $CD4^{+}TCRV\beta1^{+}$ altos têm 1,5 vezes (Intervalo de confiança de 95% de 1,18 a 5,74 vezes) mais chance de estar no grupo com GDP_{norm} abaixo de 1 do que os animais com baixos níveis dessas subpopulações.

O Risco Atribuível (RA) especifica o quanto de um evento é atribuído a um fator (PEREIRA, 2003). Portanto, 37% dos animais que estão no grupo de baixo

ganho de peso estão-no por causa da influência que os parâmetros imunes têm sobre o desenvolvimento do animal (Tabela 9).

Grupo	Incidência de GDP_{norm} abaixo de 1	Risco Relativo	Risco Atribuível
CD4:CD8 e $CD4^+TCRV\beta1^+$ "baixos"	33% (6-60%)	-	-
CD4:CD8 e $CD4^+TCRV\beta1^+$ "altos"	53,33% (35-71%)	1,51 (1,18-5,74)	37,5%

TABELA 9 – AVALIAÇÃO DE RISCO DE BAIXO GDP.
INCIDÊNCIA DE INDIVÍDUOS COM GDP_{NORM} ABAIXO DE 1 (E INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95%) NOS GRUPOS COM NÍVEIS ALTOS OU BAIXOS DE CD:CD8 E $CD4^+TCRVB1^+$ SIMULTANEAMENTE. O RISCO RELATIVO (RR) E O RISCO ATRIBUÍVEL (RA) TAMBÉM ESTÃO REPRESENTADOS

O efeito acima descrito ocorre quando se considera o GDP normalizado e a porcentagem da população de $CD4^+TCRV\beta1^+$. Entretanto, o mesmo se observa quando se relacionam o GDP absoluto, sem normalização para o período descrito, e a quantidade absoluta (células por µl de sangue) desse subgrupo de linfócitos. A quantidade absoluta de um subtipo de linfócitos no sangue calcula-se a partir do número total de linfócitos (Figura 20). Multiplica-se, então, a porcentagem de linfócitos que são $CD4^+TCRV\beta1^+$ pelo número absoluto de linfócitos totais no sangue.

Como citado, no estudo dos parâmetros absolutos, os linfócitos totais são, independentemente de outros dados, relevantes na relação com o GDP absoluto. Utilizando-se da mesma metodologia estatístico-epidemiológica descrita acima, os animais com altos números de linfócitos por microlitro de sangue têm um Risco Relativo de 1,58 (1,4 a 2,07) vezes mais chance de estar no grupo de baixo GDP. Contudo, a citometria de fluxo auxilia para aumentar essa capacidade preditiva, já que os animais com o conjunto de CD4:CD8 e $CD4^+TCRV\beta1^+$ absoluto altos têm uma chance de 2,87 vezes (1,86 a 84,17) maior de estar no grupo de baixo GDP.

O aumento da razão entre heterófilos e linfócitos, já citada neste trabalho, está relacionada com uma resposta de estresse crônico, em que há redução de

linfócitos e aumento de heterófilos (Figura 21). Evidentemente, é descrita pelo número de linfócitos, que, como demonstrado, está correlacionado com o GDP absoluto dos frangos usados neste estudo. Entretanto, como a relação considera também a quantidade de heterófilos, acredita-se que seja um parâmetro mais "confiável" do que ambos os parâmetros isoladamente, embora essa interpretação seja discutível. A heterofilia e a linfopenia, isoladamente, são mais comumente associadas ao estresse (FELDMAN *et al.*, 2006).

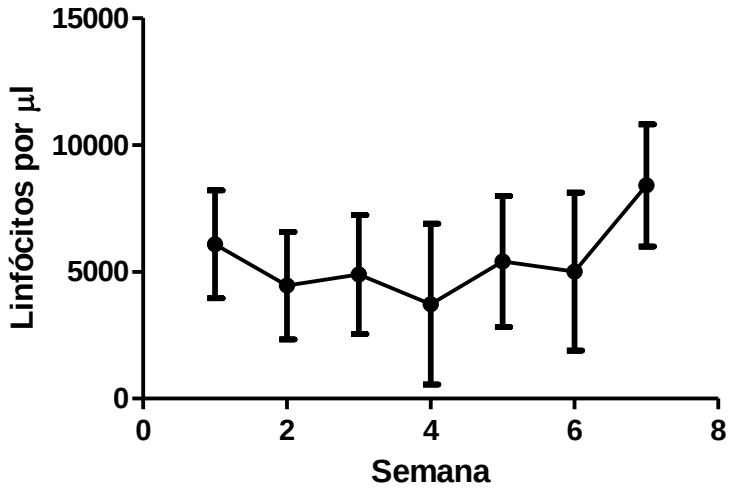


FIGURA 20 – QUANTIDADE DE LINFÓCITOS AO LONGO DAS 7 SEMANAS DE EXPERIMENTO. DADOS SÃO MOSTRADOS COMO MÉDIA ± SD.

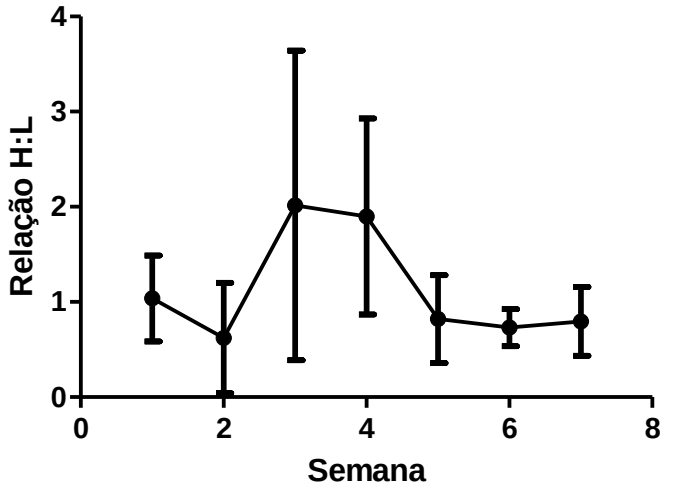


FIGURA 21 – FLUTUAÇÃO DA RELAÇÃO HETERÓFILOS:LINFÓCITOS (H:L), POR SEMANA DO EXPERIMENTO.
VALORES MAIS ALTOS INDICAM MAIORES NÍVEIS DE ESTRESSE CRÔNICO, CLASSICAMENTE DEFINIDO PELO AUMENTO DE GLICOCORTICOIDES CIRCULANTES.

Neste trabalho, efetivamente a razão H:L correlacionou-se melhor com o ganho de peso do que a quantidade de linfócitos por si só (Figura 22). A correlação entre ambos é positiva (correlação = 0,48), ou seja, quanto maior a relação entre os dois tipos de leucócitos, maior o ganho de peso.

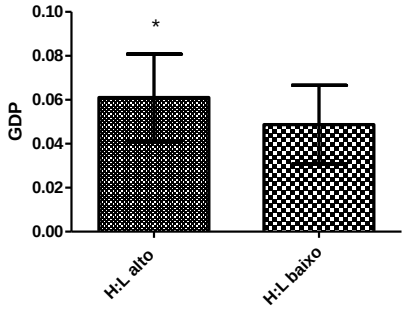


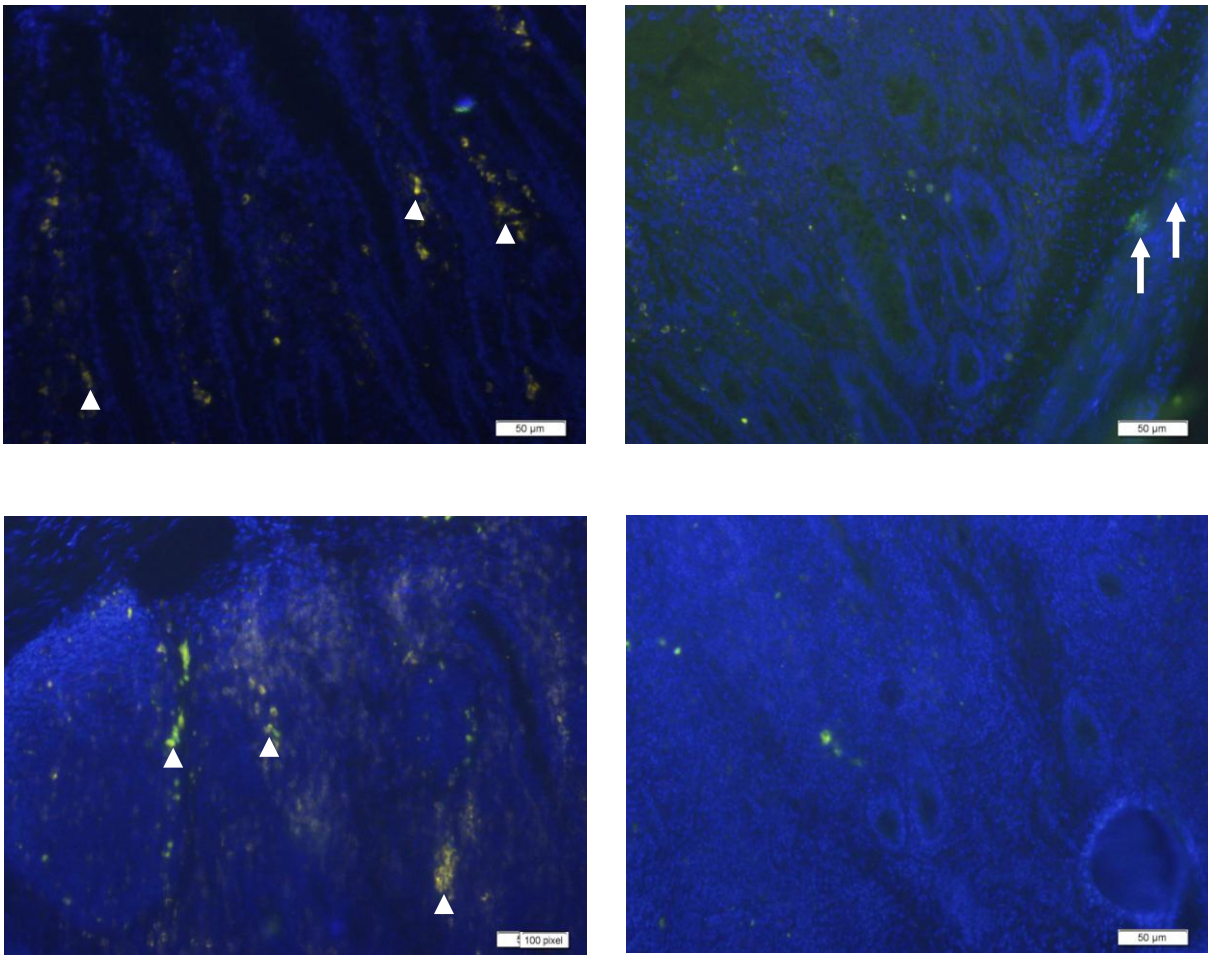
FIGURA 22 – RELAÇÃO H:L COM GDP.
FAZENDO UMA LINHA DE CORTE ENTRE AS AVES COM A RELAÇÃO H:L 50% MAIOR E 50% MENOR, AS AVES CUJA RELAÇÃO ESTAVA ENTRE AS MAIORES TAMBÉM TINHAM MAIOR GDP. NO EIXO X, OS GRUPOS COM H:L ENTRE OS 50% MAIORES OU MENORES. NO EIXO Y, GDP ABSOLUTO. *DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA EM TESTE DE FISCHER (P<0,05) ENTRE OS GRUPOS.

Sabe-se que a população $CD4^{+}TCRV\beta1^{+}$ tem função fundamental nas mucosas no auxílio à produção de anticorpos IgA (CIHAK *et al.*, 1991). A citometria de fluxo foi realizada no presente trabalho de modo a quantificar as células imunes no sangue periférico, embora as principais funções dessa subpopulação, que foi ligada ao GDP, não ocorra no compartimento sanguíneo (CIHAK *et al.*, 1991). Para compreender como esse grupo de linfócitos auxiliares relacionava-se com a função dessas células na mucosa, provável mecanismo de ação a afetar a capacidade zootécnica dos frangos, foram feitas lâminas de secções intestinais, marcadas pela técnica de imunofluorescência (Figura 23). Fragmentos do intestino delgado e das tonsilas cecais das 13 aves remanescentes ao final do experimento foram avaliados quanto à quantidade de linfócitos $TCRV\beta1^{+}$ presentes. A área total das células marcadas foi quantificada em programa de avaliação de imagens (Image Pro Plus®), e comparada à quantidade relativa (percentual) e absoluta (células por µl de sangue) de linfócitos $CD4^{+}TCRV\beta1^{+}$ circulantes. As populações dos compartimentos circulante e entérico tiveram índice de correlação forte e positiva (correlação = 0,85) (Figura 24), indicando que as aves que possuem altos índices dessas células no

sangue também os têm no intestino. A mesma correlação se confirma para a porcentagem (e não o número absoluto) de células $CD4^+TCRV\beta1^+$ circulantes, embora seja mais fraca (correlação = 0,66). Quando se considera a porcentagem total de $TCRV\beta1^+$ (não apenas $CD4^+TCRV\beta1^+$), a correlação também existe (correlação = 0,7). Interessantemente, a correlação é praticamente a mesma, e até levemente maior, entre as áreas de células $TCRV\beta1^+$ no intestino com as células $CD4^+TCRV\beta1^+$ circulantes (valor absoluto, ver correlação acima) do que quando se considera todas as $TCRV\beta1^+$ circulantes em valor absoluto (correlação = 0,83). Embora seja o subgrupo mais expressivo de células $TCRV\beta1^+$, as CD4 não são as únicas a expressarem esse receptor de linfócitos T (Tabela 6). Isso evidencia que entre todas as células a expressarem este receptor, destacam-se as os linfócitos auxiliares, por sua função nas mucosas, já bem elucidada (CIHAK *et al.*, 1991).

Não foi possível estabelecer correlação entre a quantidade de linfócitos $TCRV\beta1^+$ circulantes e estes linfócitos nas tonsilas cecais, provavelmente por limitação da técnica empregada. Como os linfócitos positivos para essa marcação são muito abundantes nas tonsilas cecais, a marcação de fundo (*background*) é muito intensa e dificulta a quantificação dos positivos (Figura 23, (A), INFERIOR).

A preservação da morfologia dos tecidos após os cortes histológicos foi examinada (Figura 25). O anticorpo utilizado neste trabalho apenas permite a utilização de cortes congelados, que têm uma capacidade maior de preservar os antígenos (Southern Biotechnology, recomendações técnicas). Entretanto, este modo de emblocamento do tecido tem a desvantagem de não ser tão eficaz na manutenção da morfologia tecidual (ENESTRÖM *et al.*, 1980). Por isso, cortes de tecido de mesma espessura, obtidos sob as mesmas condições dos cortes usados para imunofluorescência, foram corados com hematoxilina de Harris e eosina, para que fosse possível avaliar a preservação do tecido e a manutenção da arquitetura. A localização correta das células nos órgãos investigados é importante para interpretar os resultados, já que marcações em locais não habituais do tecido indicam falso-positivos (Figura 23). As células $TCRV\beta1^+$ de galinhas, as quais quase sempre expressam CD4, estão preferencialmente situadas na lâmina própria do intestino (BUCY *et al.*, 1988).



(A) (B)

FIGURA 23 – AMOSTRAS REPRESENTATIVAS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA.
(A) IMUNOFLUORESCÊNCIA TÍPICA PARA TCRVβ1, ANTICORPO FLUORESCENTE PE (MARCAÇÕES EM AMARELO, APONTADO POR CABEÇA DE SETA)) EM SECÇÃO (6µm) DE INTESTINO DELGADO (FOTO SUPERIOR), DEMONSTRANDO A PRESENÇA DE CÉLULAS POSITIVAS PARA ESTE RECEPTOR. CONTRAMARCAÇÃO DE NÚCLEO COM DAPI (EM AZUL). NA FOTO INFERIOR, MARCAÇÃO PARA O MESMO RECEPTOR (CABEÇA DE SETA), EM SECÇÃO DE TONSILA CECAL. A GRANDE QUANTIDADE DE CÉLULAS NESSE TECIDO GERA UMA MARCAÇÃO DE FUNDO QUE DIFICULTA A QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS. (B) MARCAÇÃO CONTROLE, FEITA COM ANTICORPO ANTI-TCRVB2, FLUORESCÊNCIA PE EM SECÇÃO (6µm) DE INTESTINO DELGADO (SUPERIOR) E TONSILA CECAL (INFERIOR). NOTAR MARCAÇÃO INESPECÍFICA, INCLUINDO PONTOS NA CAMADA MUSCULAR (SETAS). BARRA DE CALIBRAÇÃO = 50µm.

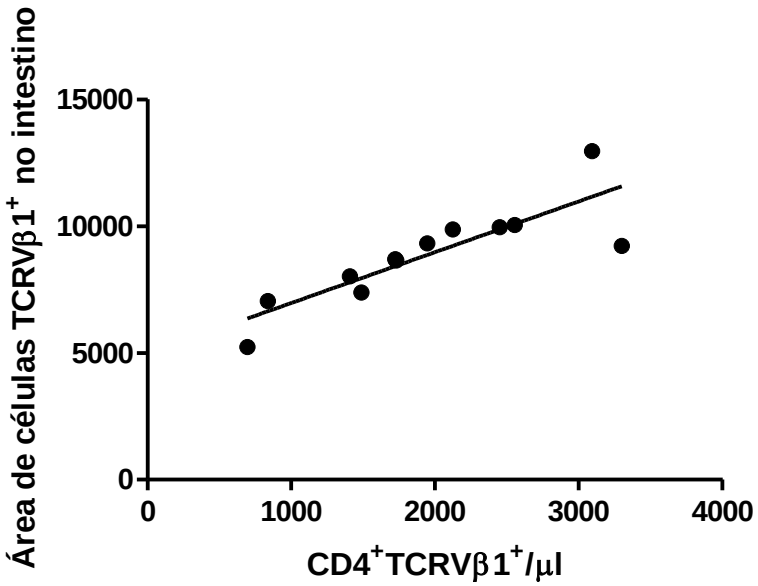
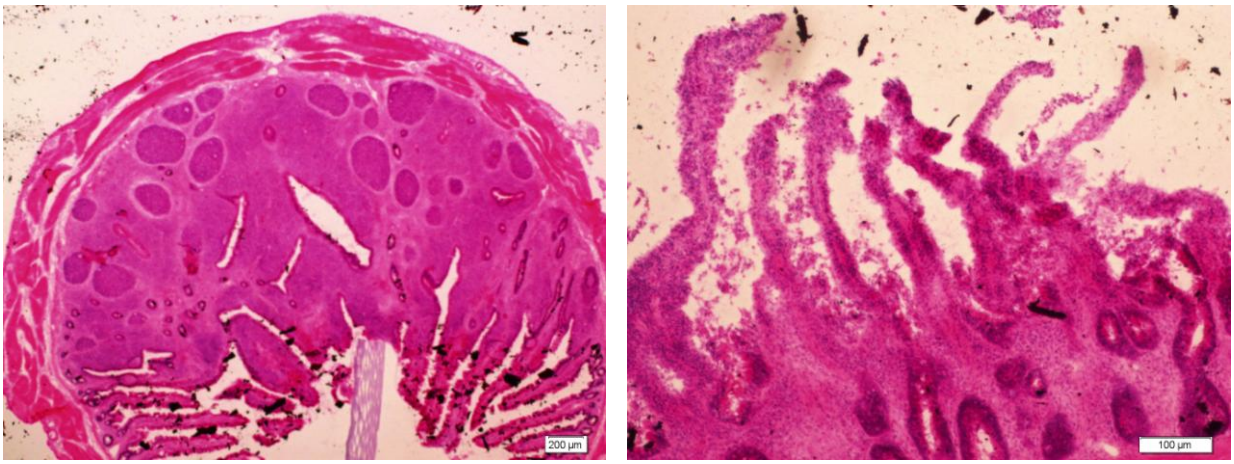


FIGURA 24 – ASSOCIAÇÃO ENTRE TCRVB1 NO SANGUE E INTESTINO.
REGRESSÃO ENTRE LINFÓCITOS TCRVβ1$^+$ NO INTESTINO E CD4$^+$TCRVβ1$^+$ (CÉLULAS/µl) NO SANGUE. EIXO X MOSTRA A QUANTIDADE DE LINFÓCITOS TCRVB1$^+$ POR CAMPO FOTOGRAFADO NO INTESTINO, EM UNIDADES ARBITRÁRIAS DE ÁREA (UA). EIXO Y MOSTRA A QUANTIDADE DE CÉLULAS TCRVB1$^+$ NO SANGUE PERIFÉRICO, EM CÉLULAS/µl. CORRELAÇÃO = 0,85.



(A) (B)

FIGURA 25 – MORFOLOGIA TECIDUAL.
A PRESERVAÇÃO DA MORFOLOGIA NORMAL DO TECIDO FOI AVERIGUADA POR COLORAÇÃO DE LÂMINAS COM CORTE SIMILAR AO USADO NAS IMUNOFLUORESCÊNCIAS (ACIMA). COLORAÇÃO POR HE (HEMATOXILINA DE HARRIS). (A) TONSILA CECAL (AUMENTO DE 4 VEZES. BARRA = 200µm). (B) INTESTINO DELGADO (AUMENTO DE 16 VEZES. BARRA = 100µm)

As alterações imunológicas que levam à queda imunológica dos parâmetros CD4:CD8 e $CD4^{+}TCRV\beta1^{+}$ também alteram a presença ou a função do complemento, conforme avaliado pelo teste de lise de eritrócitos humanos pelo plasma das aves envolvidas nos testes anteriores (Figura 26). Esse teste avalia a quantidade de anticorpos naturais circulantes e de complemento (MATSON *et al.*, 2005). Pretendia-se poder situar as alterações imunológicas vistas na citometria e suas correlações com o contexto geral do sistema imune.

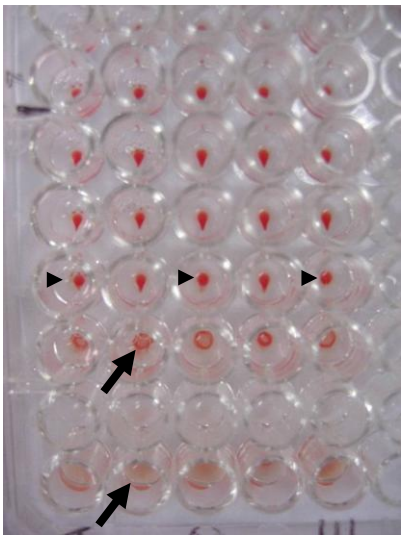


FIGURA 26 – TESTE DE HEMÓLISE E HEMAGLUTINAÇÃO FEITO COM PLASMA DE FRANGOS CONTRA ERITRÓCITOS HUMANOS.
O TESTE CONSISTE NA DILUIÇÃO PROGRESSIVA (1:2) DO PLASMA DAS AVES PARA AVALIAR A CAPACIDADE DE AGLUTINAÇÃO E LISE POR PARTE DOS ANTICORPOS NATURAIS E DO COMPLEMENTO PRESENTES NO PLASMA, QUE AGEM CONTRA OS ERITRÓCITOS DE OUTRA ESPÉCIE. CADA COLUNA NA FOTO REPRESENTA UMA AVE COM SEU PLASMA DILUÍDO PROGRESSIVAMENTE. DE BAIXO PARA CIMA, AS MAIORES CONCENTRAÇÕES DO PLASMA DOS FRANGOS. NOTAR PRESENÇA DE HEMÓLISE NAS CONCENTRAÇÕES MAIS ALTAS (EXEMPLO APONTADO PELAS FLECHAS). POÇOS AGLUTINADOS ESTÃO APONTADOS POR CABEÇAS DE FLECHAS.

Entre as aves com maior ganho de peso houve uma redução na capacidade de fazer hemólise das células humanas em teste de diluição seriada em placa de fundo em U, após 1 hora e 30 minutos de incubação a $37^{o}C$ (Figura 27). Conforme sugere a literatura (MATSON *et al.*, 2005), a capacidade hemolítica relacionou-se positivamente com a quantidade de linfócitos B, medidos por citometria de fluxo.

Porém, não foi evidenciada alteração significativa na capacidade dos anticorpos naturais em aglutinar os eritrócitos.

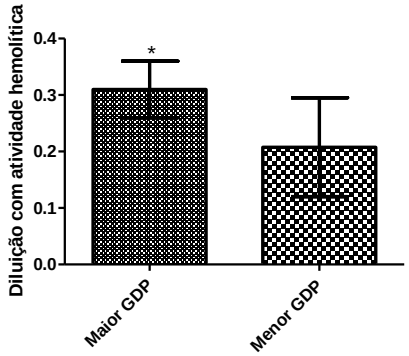


FIGURA 27 – ASSOCIAÇÃO ENTRE GDP E HEMÓLISE.
AVES COM MENOR GDP TÊM MAIOR CAPACIDADE DE LISAR ERITRÓCITOS HUMANOS EM PLACA. VALORES MAIS PRÓXIMOS DE ZERO INDICAM CAPACIDADE DE DESTRUIR AS CÉLULAS VERMELHAS HUMANAS EM DILUIÇÕES MAIS ELEVADAS, E PORTANTO MAIOR CAPACIDADE HEMOLÍTICA. EIXO Y MOSTRA AS MÉDIAS DOS VALORES DE HEMÓLISE DE CADA GRUPO AO LONGO DAS SETE SEMANAS DE EXPERIMENTO. N=55 AFERIÇÕES. *DIFERENÇA ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVA ENTRE OS GRUPOS EM TESTE DE FISHER (P<0,05%).

Para confirmar o resultado do teste de aglutinação, foi realizado um segundo experimento para avaliar a quantidade circulante de imunoglobulinas. Este teste mede a quantidade total de IgY circulante, e não apenas a quantidade de anticorpos naturais (CHENG *et al.*, 2001). Para isso, o plasma das 13 aves aos 45 dias de vida foi analisado por Western Blotting para a quantidade total de IgY/volume (Figura 28). A quantidade total de imunoglobulina Y está representada pelo valor da densitometria das bandas (Tabela 10). Está medianamente correlacionada com a quantidade de anticorpos naturais aglutinantes medidos pelo teste de hemaglutinação (correlação=0,58). Ambas parecem se corresponder, e a quantidade total de IgY corrobora o teste de aglutinação em que não se associam a outros parâmetros imunes ou ao ganho de peso.

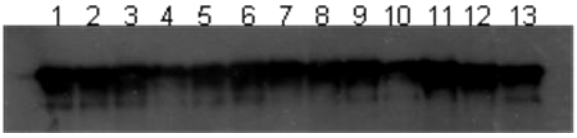


FIGURA 28 – QUANTIFICAÇÃO DE IGY NO PLASMA DE GALINHAS POR WESTERN BLOTTING.
IGY (180 KDA) FOI QUANTIFICADA POR DENSITOMETRIA COMPUTADORIZADA. BANDAS 1 A 13 CORRESPONDEM ÀS AVES TESTADAS, DE 45 DIAS DE VIDA.

Banda	Quantidade de IgY (UA)
1	20.748.280
2	18.866.601
3	18.242.437
4	16.873.103
5	16.351.743
6	19.334.826
7	21.199.800
8	23.794.813
9	23.730.032
10	22.626.718
11	23.089.910
12	23.019.815
13	24.476.241

TABELA 10 – QUANTIFICAÇÃO DE IGY.
RESULTADO DA DENSITOMETRIA DOS WESTERN BLOTS. VALOR EM UNIDADES ARBITRÁRIAS (UA).

A quantidade relativa e absoluta de linfócitos B também foi testada em sua correlação com o tamanho da Bursa de Fabrícius (Figura 29). A medição do tamanho ou peso da Bursa é um protocolo comum para aferição do estado imunológico de aves (HECKERT *et al.*, 2002), e a confirmação de que as medidas se equivalem ou estão correlacionadas é um passo na padronização do uso da citometria de fluxo como parâmetro de avaliação imune. Correlações com o tamanho da Bursa foram encontradas entre a quantidade relativa (porcentagem) de linfócitos B circulantes no início do experimento. No final do período experimental, o tamanho da bursa é fortemente influenciada pelo peso do animal, e por isso precisa ser normalizada por esse valor. O mesmo não ocorre nos primeiros dias de vida do animal. A correlação

existente entre tamanho da Bursa e porcentagem de linfócitos B circulantes desaparece ao final do período de produção.

O tamanho da Bursa de Fabrícius apresentou correlação negativa (-0,69) com o GDP normalizado, bem como com a razão Heterófilos:Linfócitos no final do período produtivo (-0,67).

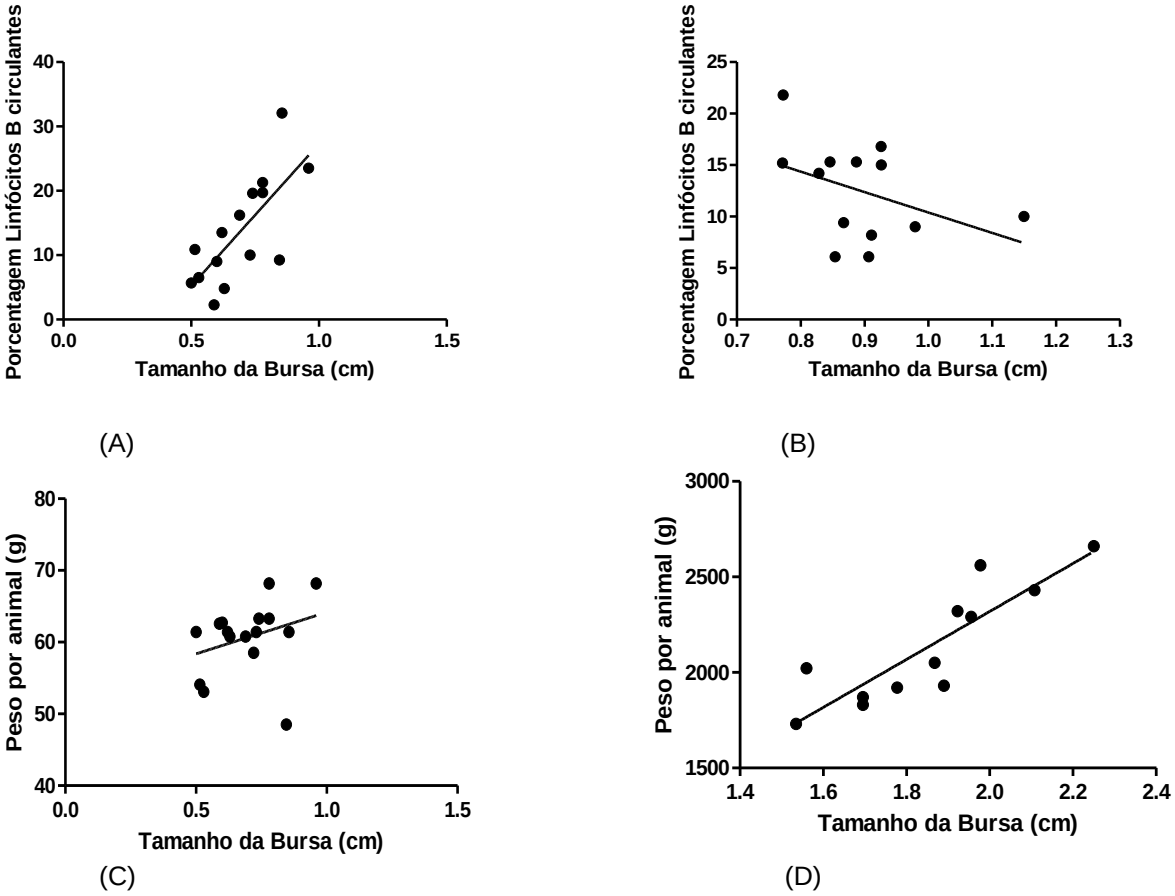


FIGURA 29 – REGRESSÃO DO TAMANHO DA BURSA DE FABRÍCIUS COM A PORCENTAGEM DE LINFÓCITOS B CIRCULANTES.
(A) MEDIÇÕES NO COMEÇO DO EXPERIMENTO. (CORRELAÇÃO = 0,66) (B) MEDIÇÕES AO FINAL DO EXPERIMENTO (CORRELAÇÃO = -0,41) O EIXO Y MOSTRA A PORCENTAGEM DE LINFÓCITOS B, MEDIDOS POR CITOMETRIA DE FLUXO. O EIXO X MOSTRA O TAMANHO DA BURSA DE FABRÍCIUS, EM CENTÍMETROS, MEDIDO POR PAQUÍMETRO. (C) CORRELAÇÃO ENTRE A BURSA E O PESO DO ANIMAL NO INÍCIO DA VIDA É PRATICAMENTE INEXISTENTE (=0,3), MAS TORNA-SE IMPORTANTE (CORRELAÇÃO = 0,77) DENTRO DE 44 DIAS (D), JUSTIFICANDO A NORMALIZAÇÃO ENTRE BURSA:PESO

A população de linfócitos T $CD8\alpha^{+}CD28^{-}$ foi comparada com as populações positivas para os marcadores de linfócitos T (Figura 30). O resultado demonstra qual o receptor de linfócitos T (TCR) que é presente nas células $CD8\alpha^{+}CD28^{-}$.

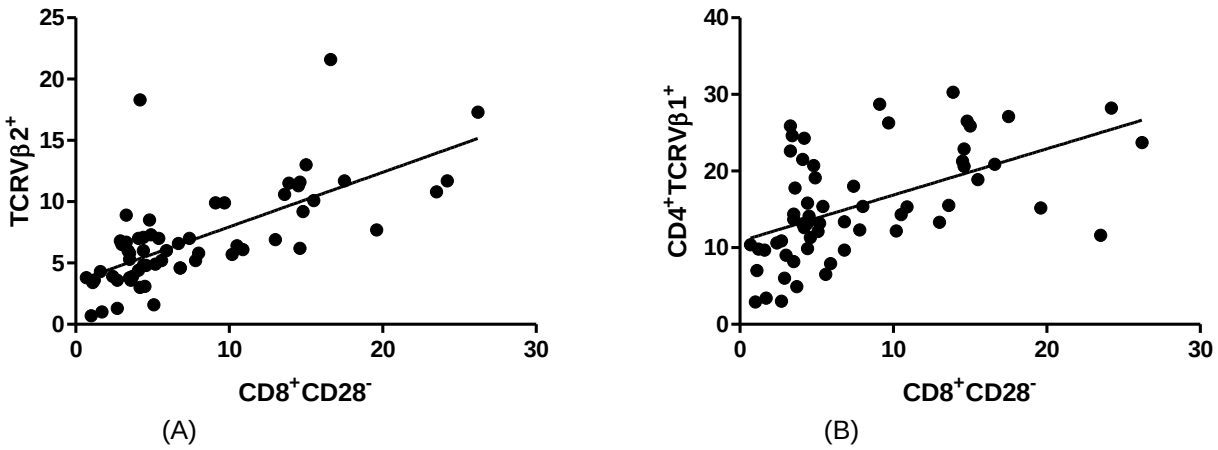


FIGURA 30 – ASSOCIAÇÃO ENTRE CD8A^{+}CD28^{-} E TCR.
REGRESSÃO ENTRE PORCENTAGEM DE CÉLULAS CIRCULANTES DE CD8α^{+}CD28^{-} E (A) TCRVβ2^{+} (CORRELAÇÃO = 0,80) OU (B) CD4^{+}TCRVβ1^{+} (CORRELAÇÃO = 0,61).

A subpopulação de células CD4^{+}TCRVβ1^{+} foi correlacionada, por sua vez, com a presença do receptor CD8α^{+}CD8β^{-}, utilizando-se os dados deste experimento de correlação entre fatores citométricos e produtividade (Figura 31A). A Figura 31B refere-se à correlação entre os parâmetros CD8α^{+}CD8β^{-} e CD8α^{+}TCRVβ1^{+}. Estes últimos dados foram extraídos do teste de aves SPF sob diferentes infecções. Este gráfico (Figura 31B) está aqui reunido para clareza da comparação dos resultados.

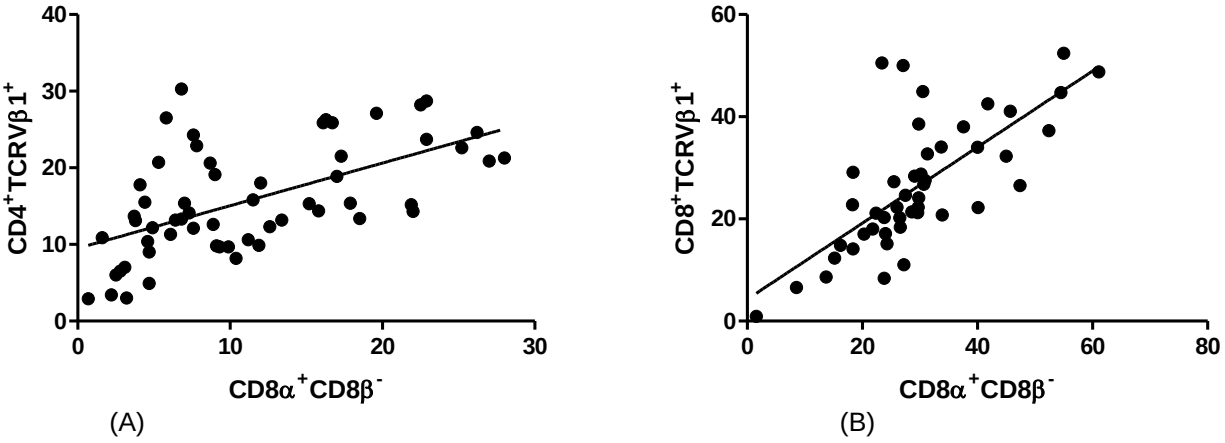


FIGURA 31 – ASSOCIAÇÃO ENTRE TCRVB1^{+}CD4 OU CD8 COM CD8AA.
GRÁFICOS DE REGRESSÃO ENTRE (A) CD4^{+}TCRVβ1^{+} E CD8α^{+}CD8β^{-} (CORRELAÇÃO = 0,67) E (B) CD8α^{+}TCRVβ1^{+} E CD8α^{+}CD8β^{-} (CORRELAÇÃO = 0,72), PROVENIENTES, RESPECTIVAMENTE, DO EXPERIMENTO DE COMPARAÇÃO DA CITOMETRIA COM PARÂMETROS ZOOTÉCNICOS E DO EXPERIMENTO DE INFECÇÃO DE AVES SPF COM DIFERENTES AGENTES.

5 DISCUSSÃO

5.1 PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA

O uso de anticoagulantes diferentes já foi reportado na literatura como fator de alteração nos resultados de citometria de fluxo (THORNTHWAITE *et al.*, 1984; NICHOLSON e GREEN, 1993).

O anticoagulante Alsever parece preservar menos os epítopos de superfície celular em relação a EDTA (Figura 4). Quando se comparam EDTA e heparina, os resultados são bastante similares (Figura 5). Uma vez que os dados na literatura recente confirmavam o uso de EDTA e heparina para a realização de imunofenotipagem por citometria de fluxo, estes foram os anticoagulantes utilizados ao longo deste trabalho (CHOWDHURY *et al.*, 2005a; BRIDLE *et al.*, 2006; FAIR *et al.*, 2008).

A temperatura de manutenção das amostras também já foi correlacionada com diferentes resultados em experimentos de citometria de fluxo e imunofenotipagem celular (EKONG *et al.*, 1992; EKONG *et al.*, 1993; RUIZ *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos para o sangue conservado em EDTA e heparina permaneceu dentro dos valores encontrados na literatura em relação à proporção de células positivas de cada subpopulação de linfócitos considerada. A população de linfócitos CD4 (FITC) encontrada na literatura é, em média, 12,8% da população total de linfócitos (FAIR *et al.*, 2008), e a razão de CD4:CD8 é de 1,3 a 1,9 (BRIDLE *et al.*, 2006). Entretanto, a proporção de linfócitos T CD8 (para FITC como fluoróforo, note-se) é, em média, 4,6% da população total de linfócitos (FAIR *et al.*, 2008), aproximando-se mais do resultado obtido com Alsever como anticoagulante, mas é cerca de 12% da população de linfócitos T (CHAR *et al.*, 1990) e até cerca de 44% da população de linfócitos T (BRIDLE *et al.*, 2006), atestando que, utilizando a metodologia citada, pode-se reproduzir dados da literatura. O método, portanto, tem a repetibilidade validada para os anticorpos utilizados. As condições de turbulência no transporte não tiveram impacto nesta breve avaliação, e o envio postal das amostras não parece apresentar um problema. Estabeleceram-se os anticoagulantes EDTA e heparina como padrões de uso por terem resultados semelhantes, levando-

se em consideração também o fato de serem mais comumente utilizados. A temperatura padrão utilizada foi de 4^{o}C, apesar de não se evidenciarem grandes diferenças entre ambas as condições.

A proporção de células TCRVβ1 positivas encontradas na literatura, dentro de uma população de linfócitos T, tem médias entre 43,9% e 50,5%, dependendo da linhagem analisada. Para TCRVβ2, as proporções ficam entre 10,7% e 10,9% (BRIDLE *et al.*, 2006). Os dados aqui obtidos (respectivamente 5,93 e 9,18%) são comparáveis apenas para TCRVβ2. Para CD8 (FITC), novamente, a proporção encontrada na literatura é de 4,6% do total de linfócitos (FAIR *et al.*, 2008), o que aproxima-se mais dos valores encontrados nesse experimento (5,92-7,01%). Para os demais parâmetros, não há dados na literatura do conhecimento do autor.

5.2 DIFERENÇAS ENTRE IDADES DE AVES SPF, E COMPARAÇÃO COM AVES MANTIDAS EM CONDIÇÕES NORMAIS

Altos valores de desvios-padrão (SD) são constantemente encontrados na literatura para a imunofenotipagem de galinhas por citometria de fluxo, embora alguns parâmetros pareçam ser mais robustos do que outros (LI *et al.*, 2000; BRIDLE *et al.*, 2006; FAIR *et al.*, 2008), e da mesma maneira isso foi visto no presente trabalho. Pode ser ponderado que mesmo para aves mantidas em um ambiente de relativa constância como o SPF, disparidades individuais tendem a representar uma variável importante na interpretação de dados de citometria de fluxo.

A literatura já tem extensivamente demonstrado que sob diferentes condições ambientais, diferentes fenótipos imunológicos são estimulados, e, portanto diferentes proporções de células são esperadas na circulação (EWALD *et al.*, 1996; CEBRA, 1999; KANEKO *et al.*, 2004; BERNDT *et al.*, 2006; BRIDLE *et al.*, 2006). Neste trabalho, a proporção de 8 subpopulações diferentes foi determinada para galinhas de postura mantidas em condições SPF, de quatro grupos etários (Figura 8, Tabela 3). Posteriormente, os dados dessas aves foram comparados com o de aves mantidas sob condições comuns.

Números reduzidos de células CD4^{+} em comparação com aves comerciais estudadas por Bridle e colegas (2006) foram obtidas para os grupos mais velhos,

porém similares aos níveis de aves de corte imunizadas mantidas em laboratório e que alimentaram-se de ração com baixos níveis de micotoxinas (SWAMY *et al.*, 2004). No presente estudo, foram encontrados números de células $CD4^+$ mais similares aos vistos por Fair e colaboradores (2008) usando galinhas não-imunizadas mantidas em liberdade, de uma variedade de ambientes (os autores citados encontraram entre 3,61% e 30,7% de $CD4^+$). Como mencionado, quantidades detectáveis da toxina zearalenona (ZEA) foram encontradas na ração das galinhas SPF usada nos experimentos descritos aqui (Resultados, Item 4.2). Aparentemente a contaminação da dieta com micotoxinas não tem efeitos na porcentagem de $CD4^+$ e $CD8^+$ no sangue periférico (SWAMY *et al.*, 2004; CHOWDHURY *et al.*, 2005a), mas doses de 1580 µg/kg de ZEA são capazes de reduzir a resposta à vacinação (GIRISH e SMITH, 2008). Menores respostas de anticorpos podem ser esperadas em aves que ingerem micotoxinas, especialmente por uma redução na capacidade das células envolvidas. Entretanto, sabe-se que a resposta imune celular é a mais afetada pela presença desses agentes, sendo este um efeito dose-dependente (GIRISH e SMITH, 2008). Swamy e colegas (2004) reportaram que rações contaminadas por quantidades e variedades diferentes de micotoxinas não provocaram alterações nas porcentagens circulantes de linfócitos T CD4 e CD8, parâmetros que também foram aferidos no presente estudo. As quantidades absolutas de leucócitos, e linfócitos mais especificamente, também não foram alteradas no trabalho citado, o que significa que a quantidade absoluta dos linfócitos T auxiliares e citotóxicos também não foi alterada. Em outro trabalho (CHOWDHURY *et al.*, 2005c), os autores não encontraram alterações hematológicas em perus que receberam toxinas de *Fusarium* (das quais a zearalenona faz parte), mas encontraram alterações a partir da 12ª semana após início da alimentação contaminada em galinhas de ovipostura (CHOWDHURY *et al.*, 2005a), mas em uma concentração de 600µg/kg de ração. Estas alterações foram basicamente uma redução generalizada na quantidade de linfócitos, e consequentemente na quantidade absoluta de suas subpopulações (mas não na porcentagem). Considerando-se esta proposição, os dois grupos mais velhos poderiam ter a quantidade de linfócitos reduzida no compartimento circulatório, embora a quantidade de micotoxinas na ração utilizada neste experimento seja inferior.

Foi constatado que aves mais velhas possuem uma proporção aumentada de linfócitos T auxiliares quando comparados às aves mais jovens. Um pequeno

aumento no número de linfócitos periféricos $CD4^+$ e B já foi verificado em aves que foram selecionados para altas respostas de anticorpos para um dado estímulo (PARMENTIER *et al.*, 1995). Infecção por *Salmonella* sp. pode alterar a distribuição de células T entre os compartimentos do corpo e provocar proliferação de linfócitos T antígeno-específica. Em animais adultos, a imunidade contra *Eimeria* sp. é dependente de células $CD4^+$ (SMITH e BEAL, 2008). Assim, uma proporção reduzida de CD4 pode indicar falta de estímulos exógenos. Quando comparadas a aves comuns, as aves SPF têm uma média inferior (Tabela 5). Os neonatos adicionalmente possuem um sistema imunológico cuja maturidade ainda não foi atingida; galinhas imunizadas ao 1º dia de vida com certos antígenos são incapazes de montar uma resposta de anticorpos (MAST e GODDEERIS, 1999). Durante o desafio experimental, todavia, a quantidade de células $CD4^+CD8\alpha^+$ está reduzida em todos os grupos na contagem absoluta (embora no grupo de Eimeria P=0,058) (Tabela 8). Isso provavelmente se dá pelo mecanismo de *homing* das células para os tecidos linfóides e daí para o local de infecção (NABESHIMA *et al.*, 2002). Uma discussão mais detalhada sobre o estímulo ao homing está presente no item 5.3. Além dos linfócitos T auxiliares (CHAN *et al.*, 1988), o anticorpo anti-CD4 é capaz de reconhecer um grupo de células duplo-positivas $CD4^+CD8^+$ (LUHTALA *et al.*, 1997a). O papel desse grupo ainda não foi totalmente esclarecido em galinhas (ZUCKERMANN, 1999), e está discutido mais adiante.

Para as análises de citometria de fluxo do presente trabalho, a população $CD8^+$ foi dividida em $CD8\alpha^+$ e $CD8\beta^+$ discernidas pelo uso de diferentes anticorpos. Receptores CD8 são feitos de um dímero (CHAN *et al.*, 1988), ou CD8αα ou CD8αβ (TREGASKES *et al.*, 1995). A população $CD8\alpha^{bright+}$ (definida por níveis maiores de fluorescência e que portanto expressam maiores quantidades da molécula CD8α na superfície celular) também coexpressam a molécula CD8β, e esta molécula nunca pode ser expressa sem aquela (ou seja, não existe um receptor CD8ββ) (BERNDT *et al.*, 2006) (Figura 11). Assim sendo, a proporção $CD8\alpha^{Dim}$:$CD8\alpha^{Bright}$ dá uma ideia da quantidade de células $CD8\alpha\alpha^+$ relativamente a $CD8\alpha\beta^+$. Os dados obtidos (Figura 8, Tabela 3) demonstraram que neonatos apresentaram uma razão $CD8\alpha^{Dim}$:$CD8\alpha^{Bright}$ maior do que as demais idades. Esta observação é oposta à observada em galinhas criadas em granjas comerciais (BRIDLE *et al.*, 2006). Nas aves comuns, essa relação é superior à do grupo SPF. A quantidade de células CD8αα é modulada pela presença de desafio intestinal, supostamente superior em

aves comuns (KANEKO *et al.*, 2004). Células T citotóxicas possuem receptores CD8αβ em suas membranas, e em células duplo-positivas ($CD4^+CD8^+$) esses marcadores são CD8αα (LUHTALA *et al.*, 1997a). Aves SPF adultas tiveram aumento significativo na porcentagem de $CD8\alpha^{+bright}$ (isto é, na quantidade de células T citotóxicas), enquanto os neonatos tiveram a menor concentração de $CD8\alpha^{+bright}$ (Figura 8, Tabela 3). As medidas de CD8α total e CD8β foram inferiores para aves de 1 dia em relação a todos os outros grupos, que foram constantes entre si. Esses resultados são similares aos níveis encontrados em outros trabalhos, embora a distribuição etária tenha sido diversa da observada aqui (BRIDLE *et al.*, 2006). CD8β provavelmente representa melhor a subpopulação de linfócitos citotóxicos, já que é expresso unicamente nesse grupo de células juntamente com CD8α (LUHTALA *et al.*, 1997a). Os receptores que possuem CD8β são responsáveis pela interação com TCR, aumentando a afinidade por MHC I (CHEROUTRE e LAMBOLEZ, 2008), e curiosamente ambos os marcadores demonstram os mesmos padrões nas proporções de células, à medida que as aves tornam-se mais velhas.

A proporção $CD4^+$:$CD8\alpha^+$ manteve-se estável entre todas as idades, e é inferior ao encontrado em outras publicações (CHENG *et al.*, 2001; BRIDLE *et al.*, 2006), bem como é inferior às aves comuns. Acredita-se que este parâmetro indique imunocompetência, e foi sugerido que, entre outros, fatores ambientais e imunização reduzam essa razão (BRIDLE *et al.*, 2006). Recentemente, uma baixa proporção entre CD4 e CD8 foi associada a imunossenescência em humanos, e razões reduzidas estariam correlacionadas com perda de capacidade imune ligada ao envelhecimento, talvez relacionada a infecções crônicas (PAWELEC *et al.*, 2004). Esse parâmetro será mais bem discutido adiante. Valores reduzidos foram encontrados em aves mantidas livres de desafios e vacinação (Tabela 5). Outro fator indicado como sendo capaz de reduzir CD4:CD8, a seleção genética, pode ser parcialmente responsável pelos resultados das aves SPF. Realmente, seleção específica de um parâmetro fisiológico pode afetar os demais, mas provavelmente não é o único (LI *et al.*, 2000; CHENG *et al.*, 2001). Algum grau de desafio sobre o sistema imune pode ser requerido para maturar o sistema imune (CEBRA, 1999; KANEKO *et al.*, 2004) sendo capaz de aumentar a relação entre células auxiliares e citotóxicas. Na realidade, patógenos intracelulares podem aumentar ou manter constantes os níveis de $CD8^+$ (reduzindo assim $CD4^+$:$CD8^+$), enquanto $CD4^+$ e as respostas por anticorpos podem ser aumentados por patógenos não-intracelulares

(CORLEY e GIAMBRONE, 2002; ZEKARIAS *et al.*, 2002). A ingestão de micotoxinas pelas aves SPF não deveria alterar a referida razão celular, e se o fizesse seria preferencialmente aumentá-la, já que as toxinas de *Fusarium* afetam principalmente respostas induzidas $CD8^+$ (CHOWDHURY *et al.*, 2005c).

Em oposição ao que supôs Bridle et al. (2006), o presente trabalho demonstrou que imunocompetência reduzida, medida pela razão CD4:CD8, não se deve a um ambiente de criação comercial e operações como imunização. Aves SPF são mantidas em um ambiente estritamente controlado, e nunca são vacinadas ao longo de suas vidas. Sob essas condições, a razão entre essas células manteve-se estável entre todas as idades testadas (entre 0,75 e 0,94), mas em um nível considerado baixo pelo grupo citado. De todos os fatores considerados predisponentes à baixa imunocompetência, aplica-se apenas o de seleção genética intensa, já que as aves são poedeiras da linhagem Leghorn. Uma razão de CD4:CD8 abaixo de 1 foi correlacionado com imunossenescência, um fenótipo de maior risco imunológico (PAWELEC *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos ainda mostram que as aves mais jovens tiveram um aumento na proporção de MHC II contra todas as outras idades (Figura 8, Tabela 3). Quanto ao MHC I, não houve padrão etário detectável, e apenas as aves juvenis I tiveram um aumento quando comparadas com os neonatos. Infecção com vírus da doença de Marek e também vacinação contra ele são capazes de reduzir a expressão de MHC I na superfície celular, sendo este um dos mecanismos da patogenia do vírus (HUNT *et al.*, 2001). Visto que as aves SPF não foram vacinadas, os valores avaliados não possuem esse viés. Percentuais para estes dois parâmetros são inéditos para aves SPF. Sabe-se que até 40% das células com receptores TCRVβ1 coexpressam MHC II (BERNDT *et al.*, 2006). Células dendríticas apresentam concentrações muito superiores de moléculas de MHC II nas suas superfícies. Uma população $MHC\ II^{Bright}$, a qual possivelmente deve conter células dendríticas, foi consistentemente encontrada em todas as amostras, exceto para os neonatos. A proporção reduzida de células dendríticas em aves SPF de 1 dia é consistente com a maturação tardia dessas células (LANGRISH *et al.*, 2002). Aves adultas demonstram um aumento significativo nesse grupo de alta densidade de MHC II, embora a quantidade total de MHC II (dim+bright) seja menor em juvenis e adultos quando comparada com neonatos (Figura 8, Tabela 3). Os valores de MHC I e II são significativamente maiores em aves SPF do que em aves comuns (Tabela

5). A quantidade de MHC II foi reduzida em situação de infecção com IBV no início da infecção (dias 5 e 10 pós infecção), e MHC II^{Bright} foi reduzido nessa mesma infecção de aves SPF (medição aos 7 dias pi). A presença de desafio leva a um aumento na expressão das moléculas apresentadoras de antígenos na superfície celular (ERF, 2004). Apenas a saída de células da circulação poderia explicar a redução que é observada nas aves comuns em relação às SPF.

Células TCRVβ1 ($TCR2^{+}$) estavam em maiores porcentagens no sangue periférico de galinhas mais velhas do que nas mais jovens. Os valores são mais próximos aos vistos em galinhas mestiças (CHAR *et al.*, 1990) do que os de aves criadas comercialmente (BRIDLE *et al.*, 2006). Células TCRVβ1 estão envolvidas na resposta imune de mucosa produzindo IgA (CIHAK *et al.*, 1991). Aves comuns têm quantidades maiores dessas células no compartimento sanguíneo (o que, em aves saudáveis, foi associado neste trabalho com quantidades maiores também no intestino, ver discussão abaixo).

É sabido que algumas infecções têm a característica de serem capazes de modular a proliferação de subpopulações de células de defesa (KANEKO *et al.*, 2004; BERNDT *et al.*, 2006), e que animais muito jovens e *germ-free* têm menos células TCRVβ1 entre seus linfócitos intraepiteliais (VINEY *et al.*, 1990). Quando os animais livres de patógenos são colonizados por microorganismos, a quantidade de linfócitos $TCRV\beta1^{+}$ aumenta no intestino até chegar a quantidades muito próximas dos animais convencionais (UMESAKI *et al.*, 1993). Propõe-se que, uma vez que as galinhas SPF têm uma carga infecciosa bastante reduzida, a necessidade para esse subtipo é limitado, e por isso também as a pequenas quantidades dessa população encontradas na literatura usando aves mantidas em laboratório (CHAR *et al.*, 1990), dados que são consistentes com os obtidos no atual trabalho. Adicionalmente, a exportação de células T tímicas destinadas para o intestino ocorre até 11 dias após a eclosão, e aves de 1 dia tem uma lâmina própria pouco desenvolvida (SMITH e BEAL, 2008), parcialmente explicando a proporção ainda baixa para os neonatos.

Para aves sujeitas a infecções, é proposto outro modelo. Ver discussão abaixo. Para os grupos infectados por IBV e *Salmonella*, embora não haja diferença estatística para o controle, há redução suficiente dos linfócitos para caracterizar uma linfopenia (FELDMAN *et al.*, 2006). Esse dado reforça a ideia de que a redução de células TCRVβ1 no sangue se deva a uma saída para locais de infecção – ambas os agentes infecciosos atuam nas mucosas. Porcentagens de TCRVβ2 (ou $TCR3^{+}$) não

diferiram entre as idades exceto para neonatos, que tiveram as maiores proporções dessas células T circulantes (Figura 8, Tabela 3), em valores comparáveis aos encontrados por Bridle e colegas (2006). A porcentagem de TCRVβ2 nas aves comuns foi reduzida quando comparada às aves SPF, e também é reduzida nas situações de infecção. Em aves suprimidas para TCRVβ1, a quantidade de células Vβ2 é aumentada (SHARMA, 1990); esse é o padrão visto com as aves SPF. As células TCRVβ1 e TCRVβ2 demonstraram padrões opostos ao longo do desenvolvimento dos animais. Esses achados não se correlacionaram com os de Bridle e colegas (2006), em cujo trabalho aves de 25 semanas de idade mostraram menores proporções de ambos os parâmetros. A população $TCR2^{+}$ (TCRVβ1) é responsável por respostas de células T restritas por MHC (SHARMA, 1990), e já foi proposto que uma redução de TCRVβ1 induz um aumento no número de células TCRVβ2 (CIHAK *et al.*, 1993).

CD28 é um receptor de coestimulação para ativação de células T. Linfócitos T ativados eventualmente perdem a expressão desse estimulador na superfície, e passam a demonstrar moléculas inibitórias (CTLA-4) (LINSLEY e LEDBETTER, 1993). Processos crônicos ou em cronificação deveriam ter um *pool* aumentado de CD28, associado provavelmente a linfócitos de memória, enquanto uma redução de CD28 que uma redução de CD28 na fase ativa de uma doença deve-se à migração (*homing*) dos linfócitos naïve (virgens) para sítios onde eles serão “iniciados” (NABESHIMA *et al.*, 2002) ou a uma ativação extensiva e excessiva e conseqüente senescência dessas células (PAPAGNO *et al.*, 2004). Os resultados obtidos (Figura 8, Tabela 3) indicam que quanto mais velhas as aves SPF, maior a proporção de células $CD28^{+}$ encontrada, até atingir um platô nas idades mais avançadas. Isso poderia se dar por um aumento na quantidade de células virgens (não ativadas) circulantes, ou, mais provavelmente, pela produção de células de memória. A média entre aves SPF e aves comuns não foi diferente no presente estudo.

O desenvolvimento do sistema imunológico não é atingido até longo tempo após a eclosão, e órgãos linfoides desenvolvem-se vagarosamente até a idade adulta (DAVISON, 2008). Por essa razão, proporção da maioria dos linfócitos estudados aumenta estavelmente até uma idade de maturidade. Muito pouco desafio externo (infeccioso) é apresentado a esses animais por causa da biosseguridade que envolve as granjas SPF. Diferentes condições e desafios foram correlacionados com saída e transformação de células imunes da circulação sanguínea para atingir o

tecido afetado ou órgãos linfoides (RUSSELL *et al.*, 1997; MCMICHAEL e ROWLAND-JONES, 2001; BARUA e YOSHIMURA, 2004).

Os valores absolutos de células leucocitárias demonstraram um aumento na relação H:L (TABELA 4). Esta relação indica, ainda que rusticamente, um estado de estresse crônico nos animais (HECKERT *et al.*, 2002). O leucograma típico de estresse é caracterizado por heterofilia e linfopenia, o que levaria a uma relação H:L aumentada. A relação dentro dos limites da normalidade estaria em cerca de 0,34 a 0,42, variando a 0,95 em galos adultos e 0,51 em pintainhos de 10 dias (FELDMAN *et al.*, 2006). Outros pesquisadores já descreveram um aumento na relação H:L em aves com micotoxicose (PEROZO *et al.*, 2003), o que também seria válido para explicar o aumento desta razão observada no presente estudo. Apesar de todas as idades estarem sujeitas à micotoxicose, visto que a ração de todas estavam contaminadas, o longo período ingerindo as toxinas podem ter sido determinantes. Em experimento utilizando micotoxinas de fungos *Fusarium*, (CHOWDHURY *et al.*, 2005b) constataram que apenas a partir da 12ª semana passaram a aparecer efeitos imunológicos da contaminação.

Esses resultados indicam muitas diferenças entre aves em condições SPF e galinhas em condições comerciais regulares. O conhecimento desses parâmetros, e, especialmente de como eles variam sob diferentes situações é de importância para futuros experimentos e na interpretação de seus resultados. Pretende-se que, ao trabalhar com aves de criações comerciais, os resultados obtidos aqui permitirão melhor compreensão de cada fator que é adicionado, como micotoxinas, infecções, imunização, entre outros.

5.3 INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE AVES SPF POR QUATRO AGENTES INFECCIOSOS E DE GALOS POR IBV

Várias cepas do vírus de Bronquite Infecciosa das Galinhas (IBV), da família *Coronaviridae* causam uma doença em galinhas que envolve os sistemas respiratório, entérico, reprodutivo e rins, especialmente em neonatos e aves jovens (SHALK et al., 1931, *apud* (COLLISSON *et al.*, 2000)). Vacinas disponíveis são frequentemente ineficientes em proteger contra a infecção com IBV, em parte por causa da variação genética atribuídas a diferentes cepas. Assim, essa doença

permanece uma preocupação para a indústria avícola. A presença de anticorpo neutraliza o vírus, mas proteção eficiente contra a doença e eliminação do agente dependem de imunidade citotóxica. Essas células protetoras são principalmente do fenótipo $CD8^{+}TCRV\beta1^{+}$, e atuam eliminando IBV durante as três primeiras semanas pós-infecção e impedindo doença aguda. A literatura sugere uma “passagem” para a resposta humoral na fase mais avançada ou crônica da doença (COLLISSON *et al.*, 2000).

Em um trabalho cujo objetivo era encontrar peptídeos imunogênicos do IBV, (YANG *et al.*, 2009) foi visto um aumento na porcentagem das subpopulações de células $CD4^{+}$ e $CD8^{+}$ circulantes, o que foi considerado como um aumento de resposta imune contra os epítopos que o grupo estudava; e foram associados a vacinas com maior capacidade de proteção. Os antígenos que apresentavam maior aumento nas porcentagens de CD4 e CD8 no sangue periférico também eram capazes de induzir respostas com maiores títulos de anticorpos. Nesse trabalho, tratava-se de vacinas de peptídeos, e não de vacinas replicantes atenuadas. Nas situações de infecção, a produção de anticorpos e a resposta celular são mais importantes no local da infecção, justificando a intensa saída de células da circulação. Em infecções por IBV, há um aumento na secreção de IgA nos locais afetados com maior presença de linfócitos T auxiliares (CD4) no local de infecção, os quais são provavelmente portadores do receptor TCRVβ1 (CIHAK *et al.*, 1991; VAN GINKEL *et al.*, 2008). No presente trabalho, foi verificada uma linfopenia no grupo portador de IBV (Tabela 7), e alguns dos subtipos mais reduzidos durante a infecção foram células $CD8^{-}TCRV\beta1^{+}$, que são em sua maioria $CD4^{+}$ (BERNDT *et al.*, 2006) as células $CD8^{+}TCRV\beta1^{+}$ em número absoluto – responsáveis pela atividade citotóxica, e as células $CD4^{+}CD8^{-}$ e $CD4^{+}CD8^{+}$. Uma das causas de linfopenia é a saída de células linfocitárias para os locais afetados (FELDMAN *et al.*, 2006).

Os dados obtidos com a avaliação da infecção por IBV ao longo de 45 dias confirma a infecção de aves SPF, e demonstrou que a queda na quantidade de células CD4, CD8α e $TCRV\beta1^{+}$ ocorre realmente dentro da fase inicial da doença (reduzida entre os dias 5 e 10). Após esse período, as quantidades dessas células retornam a níveis semelhantes ao controle no dia 17 pi (Figura 12). YANG e colegas (2009) mostraram o aumento na porcentagem de células na circulação no dia 21 após a vacinação, e (RAJ e JONES, 1996) verificaram que houve aumento na quantidade de células em pulmão, traqueia e rins infectados entre os dias 1 e 5 pi.

Infecções como a provocada pela influenza em humanos, na sua fase aguda, apresentam uma linfocitopenia, mas um aumento relativo de células T citotóxicas efetoras. Acredita-se que grande parte da redução do número absoluto de linfócitos deva-se principalmente ao fenômeno denominado *homing* (endereçamento), em que há a saída dos linfócitos virgens (*naïve*) (caracterizados pelo fenótipo $CD8^+CD28^+$) da circulação, e a sua entrada nos tecidos linfóides, onde poderiam ser ativados. Também há redução absoluta de linfócitos T citotóxicos efetores (marcados pelo fenótipo $CD8^+CD28^-$), mas em proporção menor. Isso alteraria o *pool* de células circulantes em suas proporções (NABESHIMA *et al.*, 2002).

Por essa razão, decidiu-se a avaliar, a partir do dia 17 pós-infecção com IBV em galos, além dos 8 anticorpos individualmente, a porcentagem de células CD8α que seriam positivas ou negativas para CD28, através de uma dupla marcação. O que se observou foi um aumento estatisticamente significativo do número de células efetoras ($CD8^+CD28^-$) em relação às aves controle, aumentando progressivamente nas três aferições (Figura 13). É sugestível que, ou a ave encontra-se ainda na fase aguda de infecção ou que a infecção não apresenta uma fase aguda definida como a vista na influenza (e então os dias anteriores deveriam apresentar valores intermediários entre o controle e o dia 17) ou a infecção caminha para a resolução ou cronicidade (e neste caso os dias anteriores deveriam apresentar valores maiores que os do dia 17). Já no dia 7 pi, contudo, as aves SPF infectadas por IBV apresentavam quantidades altas de $CD8^+CD28^-$ em relação ao controle. Aferições posteriores provavelmente deveriam ter revelado aumentos também progressivos. Até o dia 17, o relato dos tratadores dos animais era de que estes não apresentavam quaisquer sinais da doença, o que sugere que não houve uma fase aguda de proliferação viral. Mesmo assim, o parâmetro $CD8^+CD28^-$, que esteve aumentado nas aves testadas, demonstrou o peso da infecção subclínica sobre o sistema imunológico.

Além do aumento de células T CD8 efetoras, também já foi relatada uma redução no número de células $CD8^+CD28^+$ na fase aguda da influenza, enquanto que a proporção CD4:CD8 manteve-se constante durante todas as fases clínicas. Contudo, o número de células $CD8^+CD28^+$ não caiu – o estudo sugere que essa redução deva-se ao homing dessas células virgens para os linfonodos (NABESHIMA *et al.*, 2002).

Foi verificada uma redução na quantidade circulante de células MHC II$^{bright+}$ nas aves infectadas por IBV em relação ao controle (Figura 10, Tabela 6), e a avaliação serial de galos infectados evidenciou que a quantidade dessa subpopulação tende a ser reduzida com o passar do tempo (ANEXO 5, Figura 12). Já foi proposto na literatura que após infecção pulmonar por influenza, há um aumento transiente e posterior redução da migração de células dendríticas pulmonares para os linfonodos regionais, onde elas serviriam para ativar os linfócitos. Isso poderia suprimir uma resposta imune subsequente contra patógenos secundários oportunistas (LEGGE e BRACIALE, 2003).

O vírus da doença de Gumboro (*Infectious Bursal Disease Virus* - IBDV) é um vírus comum em galinhas, da família *Birnaviridae*. Ele atinge linfócitos B na Bursa de Fabrícius, o que resulta na redução circulante dessas células e de anticorpos séricos. Há também evidências de destruição de outros órgãos linfoides, e portanto a imunossupressão causada pela doença de Gumboro afeta tanto a imunidade humoral quanto a celular. A infecção da Bursa leva à infiltração de linfócitos T nesse órgão, para os sítios de replicação viral. O vírus reduz a capacidade mitogênica de linfócitos em resposta a estímulos – característica importante nas descrições de imunossenescência. Ao longo da infecção, ocorre entrada significativa de células T (tanto citotóxicas quanto auxiliares) para o parênquima de órgãos linfoides (CORLEY e GIAMBRONE, 2002; PAWELEC *et al.*, 2004). Como indicado em nossos resultados (Figura 10), houve redução na proporção e na quantidade absoluta de células $CD4^{+}CD8^{+}$ circulantes nas aves infectadas por IBDV, bem como para a população de CD8αα e $CD8\alpha^{+}TCRV\beta1^{+}$, $TCRV\beta1^{+}$ total (não apenas CD8α) e também TCRVβ2. As células $CD8^{+}CD28^{-}$, já descritas aqui em sua relação com imunossenescência apresentam-se nos níveis mais elevados entre as quatro infecções estudadas em relação ao controle. Outro grupo pesquisando a doença de Gumboro não encontrou redução na porcentagem circulante de CD4 ou CD8 nessa doença, e apenas a quantidade de linfócitos B esteve alterada (RODENBERG *et al.*, 1994).

Coccidiose é a principal doença parasitária de galinhas. Essa doença causa perdas econômicas significativas para produtores devido a mortalidade, malabsorção, redução do ganho de peso ou ovipostura. O ciclo de vida da *Eimeria* – agente causal da coccidiose – inclui estágios intracelulares e extracelulares, a imunidade contra esse agente é complexa (LILLEHOJ *et al.*, 2004). Todas as

espécies de *Eimeria* foram utilizadas no desafio experimental utilizado para o presente trabalho. A resposta contra as três espécies é similar (BESSAY *et al.*, 1996). Imunidade humoral contra *Eimeria* é produzida tanto na circulação sanguínea quanto nas secreções de mucosa. A presença de anticorpos contra oocistos é eficaz para impedir a sua transmissão, mas não impede os efeitos patogênicos de esporozoítos ou merozoítos. A resposta celular é a mais importante na defesa contra *Eimeria*, e a supressão experimental de linfócitos T reduz significativamente a proteção do hospedeiro contra o agente (LILLEHOJ *et al.*, 2004). A quantidade de linfócitos intraepiteliais intestinais em galinhas infectadas por *Eimeria* spp. foi reportada como aumentada a partir do dia 4 pi para os grupos de $CD4^+$, $CD8^+$ e $TCRV\beta1^+$ - $TCRV\beta2^+$ não foi avaliada (CHOI *et al.*, 1999b). Outros dados da literatura divergem quanto à dinâmica dos linfócitos durante a infecção, refletindo a complexidade da resposta imune contra esses agentes (LILLEHOJ *et al.*, 2004). O aumento da quantidade de células linfocitárias no intestino é acompanhado por uma redução no *pool* circulante, e essas variações acompanham o ciclo de vida do parasito. Já foi relatada uma redução na quantidade circulante de linfócitos auxiliares e citotóxicos entre os dias 4 e 6 pi, acompanhados de uma tendência inversa no intestino. Entretanto, já no dia 8 pi há um aumento na quantidade de linfócitos $CD4^+CD8^+$ no sangue, e essas células teriam aumento de proliferação em resposta à infecção e produzem e secretam IFNγ (BESSAY *et al.*, 1996; BREED *et al.*, 1996; BREED *et al.*, 1997).

Com relação aos dados obtidos no presente trabalho, as aves SPF infectadas por *Eimeria* spp. foram as que demonstraram menores alterações em relação ao grupo controle. A quantidade absoluta de células $TCRV\beta2^+$ e a porcentagem e a contagem absoluta de $CD8\alpha^+CD8\beta^-$ foram reduzidas em relação ao controle (no sétimo dia pi). Como explanado, uma redução é esperada até o sexto dia após a infecção, e a partir do oitavo dia o quadro rapidamente se reverte, elevando os valores especialmente de $CD4^+CD8^+$. Esse grupo de células esteve estatisticamente similar ao controle, e talvez isso se deva ao período em que a coleta foi feita (dia 7 pi), justamente quando se espera que esteja ocorrendo uma transição de uma quantidade reduzida para uma quantidade elevada de linfócitos circulantes. Para todos os outros subtipos celulares avaliados não houve diferença do grupo infectado por *Eimeria* spp. em relação ao controle. Alguns parâmetros, como as moléculas MHC, não haviam sido avaliados na literatura discutida. Para

outras marcações – como TCRVβ1^{+}, provavelmente se aplique a mesma explicação do que ocorreu para CD4^{+}CD8^{+}, ou seja, o dia avaliado (7 pi) é um período de transição da quantidade circulante de células.

Salmonella sp. tornou-se uma das principais causas de intoxicação alimentar em humanos nas últimas décadas. A bactéria invade as células intestinais, podendo atingir ovários, carregando o agente pelo ovo para o consumidor final. A doença em galinhas é caracterizada por sinais clínicos e mortalidade em aves jovens, mas não em animais com mais de algumas semanas de vida (BERNDT *et al.*, 2006).

Asheg e colegas (ASHEG *et al.*, 2003) demonstraram uma redução no número de células CD4^{+} e CD8^{+} no sangue periférico de galinhas infectadas com *Salmonella enteritidis* em comparação com o grupo controle (não-infectado). Ao longo da progressão da infecção, entre os dias 2 e 21 pi há infiltração de linfócitos T de ambos os fenótipos no local da infecção, que pode ser os ovários ou o intestino, chegando a ocupar 12% da área da lâmina própria durante a infecção (VAN IMMERSEEL *et al.*, 2002; BARUA e YOSHIMURA, 2004; BERNDT *et al.*, 2006). O linfócito T predominante em infiltrados nos tecidos linfoides é o TCRVβ1 (HOLT *et al.*, 2010). O encontro entre as células imunes e a bactéria induz forte expressão de citocinas pró-inflamatórias, que ajudam a manter a infecção no seu foco primário (KAISER *et al.*, 2000). Aves infectadas por *Salmonella* no presente trabalho também apresentaram linfocitopenia (Tabela 7), sugerindo saída de células linfocitárias da circulação para os locais de infecção. A infecção foi seguida por redução na proporção e na contagem absoluta de células CD8αα, aumento bastante relevante de CD8^{+}CD28^{-} absoluto e porcentual, redução de TCRVβ2^{+} absoluta e percentualmente, redução na quantidade absoluta de CD4^{+}CD8^{+}, CD4^{+}CD8^{-}, redução absoluta de CD8α^{+}TCRVβ1^{+} e de MHC II$^{bright+}$. A soma desses resultados confirma saída celular, de ambos os braços da resposta adaptativa (humoral e celular) para órgãos linfoides e locais de infecção. Entretanto, há tendência de redução em relação ao controle na razão CD4:CD8 absoluta neste grupo. Infecção persistente e consequente redução na proporção CD4:CD8 já foi reportado, e é fator ligado à senescência imunológica (PAPAGNO *et al.*, 2004; PAWELEC *et al.*, 2004).

A quantidade de células CD8^{+}CD28^{-} aparece aumentada provavelmente porque, após ser ativada e sofrer as modificações em sua superfície, retorna à circulação com o novo fenótipo (NABESHIMA *et al.*, 2002). As outras células passam pelo mesmo processo, mas não são detectáveis as alterações de suas ativações, só

podendo ser diferenciadas quando se replicam extensivamente ou saem da circulação.

Das infecções experimentais, apreende-se que os parâmetros $CD8^{+}CD28^{-}$, $CD8\alpha^{+}CD8\beta^{-}$ e $CD4^{+}CD8^{+}$ são especialmente robustos, ao estarem constantemente alterados em diferentes situações experimentais, e refletem rapidamente o quadro da situação imune do animal sob desafio. O parâmetro $CD8^{+}TCRV\beta1^{+}$ e $CD8^{-}TCRV\beta1^{+}$ parecem ser muito relevantes para infecções virais de mucosa, confirmando dados da literatura (COLLISSON *et al.*, 2000). Outros parâmetros como CD4:CD8, TCRVβ2 e as respostas por MHC auxiliam na interpretação dos primeiros.

5.4 PARÂMETROS CITOMÉTRICOS, SEU EFEITO SOBRE A PRODUTIVIDADE E MECANISMOS DE AÇÃO DO SISTEMA IMUNE SOBRE A CAPACIDADE PRODUTIVA

O período de duração do experimento, de 45 dias, é o máximo médio de produção de aves de corte, onde a produtividade é mais intensa (Figura 18). Pequenas alterações em quaisquer fatores nesta fase têm um grande impacto sobre os resultados zootécnicos. Produzir frangos de corte para além deste período torna-se desvantajoso economicamente, pois há queda da capacidade de conversão alimentar (portanto, é necessário fornecer mais alimento para se manter a mesma taxa de ganho de peso) (RAUW *et al.*, 1998). Do mesmo modo, é provável que o sistema imune afete mais a produtividade dentro dessa faixa em que há um crescimento exponencial dos animais, onde a capacidade zootécnica é mais responsiva a pequenas alterações. Após a fase de crescimento rápido dos animais, entra-se em uma fase lenta, onde alterações mais sutis têm pouca expressividade (KERR *et al.*, 2001).

As aves testadas não foram submetidas a qualquer desafio, infeccioso ou ambiental. Foram mantidas em uma densidade utilizada frequentemente nas granjas comerciais (11 aves/m^2) (STAMP DAWKINS *et al.*, 2004), onde é habitual que as aves tenham ganhos de peso diferenciados entre si, embora tente-se sempre manter uniformidade. Trabalhou-se com a hipótese de que a variação “gaussiana” da população de aves em relação aos seus ganhos de peso (GDPs) seja suficiente para

demonstrar como diferentes capacidades imunológicas influenciam na capacidade zootécnica (Figura 17).

O estudo de imunossenescência populacional em indivíduos idosos, citado na introdução, foi conduzido por desenhos experimentais longitudinais de Coorte, ou seja, com repetidas medidas da mesma população ao longo de um período de tempo, em que o grupo controle é estabelecido dentro da população sem alocação aleatória da exposição ou não aos fatores de risco. Assim, os grupos são formados por observação das situações na vida real (WIKBY *et al.*, 1994; FERGUSON *et al.*, 1995). Para o presente estudo, método de características equivalentes foi usado para analisar o fenótipo de risco imune para baixo ganho de peso, sem que fosse previamente separado um grupo exposto ao não exposto, sendo que esses foram definidos ao longo do experimento após a análise dos dados colhidos repetidamente. O experimento realizado para tal fim ainda apresenta constituição de estudo de laboratório por utilizar uma amostra populacional controlada, sem necessidade de pareamento por não apresentar variações ambientais, de exposição, etc., entre os membros analisados no estudo (PEREIRA, 2003).

5.4.1 Proporção CD4:CD8 e $CD4^{+}TCRV\beta1^{+}$ em relação ao ganho de peso – O Fenótipo Imune de Risco para Baixo GDP

Este trabalho demonstrou que, em aves saudáveis, altos índices do subgrupo linfocitário de $CD4^{+}TCRV\beta1^{+}$ e da proporção CD4:CD8α em conjunto são fatores causais e predisponentes a um baixo Ganho de Peso (GDP), tanto em termos absolutos (número de células por microlitro de sangue) quanto em termos relativos das subpopulações do compartimento sanguíneo (Figura 19, Tabela 9). Animais que possuem um número alto desses dois fatores circulantes apresentam uma chance, aqui descrito como um *risco*, de 1,51 (1,18 - 5,74, IC 95%) vezes maior de estar no grupo de animais que apresenta um GDP inferior à média do grupo. Quando se considera a quantidade absoluta de células no sangue, o *risco* é de 2,87 vezes (1,86 a 84,17). Portanto, foi descrito que dois parâmetros em conjunto avaliados por citometria de fluxo são capazes de medir o *risco* de um grupo de animais ter um baixo desempenho devido à influência de um parâmetro imunológico. Para esta ligação entre medidas imunológicas e ganho de peso, sugere-se o nome de Fenótipo ou Perfil Imune de Risco para Baixo Ganho de Peso.

A consistência da associação é dependente do fato de que dois parâmetros são considerados em conjunto. Há descrições na literatura sobre relações CD4:CD8 superiores em aves com maior produtividade, embora sejam incoerentes ao relatar que essas aves também são mais suscetíveis à infecção, número de linfócitos podendo ser tanto maiores quanto menores (neste trabalho, aves com razão CD4:CD8 alta ou linfócitos em altos níveis, ambos têm GDP baixo) (LI *et al.*, 2000; CHENG *et al.*, 2001).

Outros autores (CHEEMA *et al.*, 2003) chamaram a atenção para o fato de que é improvável que correlações genéticas entre ganho de peso e respostas imunes sejam próximas a perfeição (ou seja, correlações de 1 ou -1).

É importante ressaltar que esse efeito relacionado ao ganho de peso é evidenciado no presente trabalho em aves clinicamente saudáveis, mantidas sob condições de higidez, em densidade (ave/m^2) padrão. Em aves sob desafio infeccioso essa associação inversa entre capacidade imune e GDP não necessariamente deve ser verdadeira, visto que o GDP estará ligado à capacidade de se reverter e eliminar a infecção, e isto pode ser observado nos experimentos já descritos aqui embora sem análise estatística. Seleção de longo prazo para produção em um meio ambiente levará a um aumento da produção naquele ambiente, mas não necessariamente esses animais melhorados irão ter um desempenho igualmente bom em outra situação (VAN DER WAAIJ, 2004). As aves que no presente teste se mostram mais fracas imunologicamente, e, portanto com maiores GDP, provavelmente seriam debilitadas no combate à pressão infecciosa. Quando se observa a porcentagem de células TCRVβ1$^+$ no estudo das infecções experimentais de aves SPF (Figura 10, Tabela 3) e na avaliação da infecção de IBV ao longo de 45 dias (Figura 12, ANEXO 5), o percentual total de linfócitos com este receptor cai no período de infecção (embora se trate da porcentagem total de células TCRVβ1$^+$, e não do subgrupo específico CD4$^+$TCRVβ1$^+$). De acordo com as conclusões propostas no estudo sobre GDP, seria de se supor, portanto, que estas aves teriam maior GDP do que o grupo controle, sem infecção. Novamente, como discutido, provavelmente nestas aves há necessidade da presença de células imunes, onde antes elas eram custosas metabolicamente, e a presença de infecção nestes animais será o maior determinante de ganho de peso, e não o sistema imune. Novos estudos serão necessários para dar uma resposta definitiva a essa questão. Quando se trata da comparação entre aves SPF e aves comuns, o uso do

parâmetro para prever GDP provavelmente torna a ser válido, visto que ambos os grupos estão em estados hígidos. As aves SPF, sem a presença de microbiota a estimular um sistema imune mais vigoroso (CEBRA, 1999; DIBNER *et al.*, 2008), reverte esse custo metabólico para a capacidade produtiva – por isso, apresenta menor proporção CD4:CD8 e TCRVβ1$^+$ do que as aves comuns. Dados da literatura corroboram essa proposta. Aves livres de patógenos apresentam melhor digestibilidade de nutrientes (DIBNER *et al.*, 2008), e menos células TCRVβ1$^+$ no intestino (UMESAKI *et al.*, 1993). Aves selecionadas para maior ganho de peso apresentaram maior mortalidade durante infecções (NESTOR *et al.*, 1996). Linhagens recentes de galinha (de 1991) apresentam mortalidade 4 vezes superior ao final do período produtivo do que linhagens antigas, de 1957 (HAVENSTEIN *et al.*, 1994). Testando uma linhagem Ross de 2001 contra a linhagem de 1957 (“caipiras” ou *randombred*), outros autores (CHEEMA *et al.*, 2003) verificaram que a imunidade adaptativa da linhagem mais nova foi reduzida quando comparada com a linhagem antiga.

No atual trabalho, para investigar como a medida de um parâmetro imunológico no sangue periférico se relacionava com o ganho de peso, foram feitas contagens dessas mesmas células imunes em um dos seus locais de ação, o intestino. Os linfócitos TCRVβ1$^+$ são células T, portadoras de um receptor de superfície (TCR) específico (αβ Vβ1). A produção de imunoglobulina A (IgA) nas mucosas é dependente da existência desse subgrupo específico de linfócitos (CIHAK *et al.*, 1991).

Correlação forte e positiva foi encontrada entre a quantidade de linfócitos TCRVβ1$^+$ na lâmina própria do intestino e na quantidade (absoluta ou percentual) de linfócitos CD4$^+$TCRVβ1$^+$ no sangue (Figura 24).

Já foi descrito na literatura (BARUA e YOSHIMURA, 2004) que a quantidade de linfócitos aumenta nos tecidos durante um processo infeccioso. A pressão infecciosa do ambiente e a correspondente resposta imunológica poderiam explicar porque há a correlação negativa entre GDP e CD4$^+$TCRVβ1$^+$ demonstrada no presente trabalho. Assim como já foi descrito anteriormente na literatura (VAN DER WAAIJ, 2004), as aves aplicam mais energia metabólica para os parâmetros para os quais foram selecionados, dentre os quais o principal é ganho de peso, para os frangos de corte. Entretanto, em condições subótimas como as mantidas em granjas comerciais (e neste experimento), e com a seleção para menor ingestão de

alimentos (conversão alimentar otimizada), precisa ocorrer um desvio de energia (*trade-off*) entre características de manutenção como a resposta imune – preteridas no processo de seleção – e as características zootécnicas. Portanto, quanto mais um animal for selecionado dentro desses parâmetros, maior será o *trade-off* e a importância do sistema imune em determinar o ganho de peso.

Porém, acredita-se que em estágios de infecção ativa e doença, a correlação entre quantidade de células no tecido e no sangue se inverta, como já discutido para as infecções experimentais, porque a demanda tecidual é maior que a capacidade produtiva dos órgãos linfoides (BESSAY *et al.*, 1996).

Ainda não foram esclarecidas quais características definem as células TCRVβ1^{+}. (BERNDT *et al.*, 2006) demonstraram que em galinhas as formas de TCRVβ1^{+} CD8αα^{+} e TCRVβ1^{+} CD8αα^{-}, mas não TCRVβ1^{+}CD8αβ^{+} coexpressam em grande parte CD4, e também passa a expressar mais MHC II quando o CD8 para de ser expresso. Assim, a forma CD8α^{+}TCRVβ1^{+} detectada no experimento de aves SPF sob infecções poderia ser uma forma predecessora ou intermediária das células CD4^{+}TCRVb1^{+} detectadas no último experimento.

A influência do sistema imunológico sobre os parâmetros zootécnicos (que se referem à produtividade animal) não é uma descrição inédita na literatura veterinária (NORDLING *et al.*, 1998; CHENG *et al.*, 2001; CHEESEMAN *et al.*, 2004; BUEHLER, 2008). Porém, a influência direta de parâmetros facilmente mensuráveis sobre o Ganho de Peso ainda não havia sido exposta. A citometria de fluxo poderá tornar-se uma metodologia de uso comum para compreender como a manipulação do sistema imune de frangos (através de imunizações, uso de imunoestimulantes, presença de micotoxinas na ração, etc.) pode estar afetando a produtividade *a campo*.

5.4.2 Relação Heterófilos:Linfócitos (H:L) e GDP

Intuitivamente poder-se-ia supor uma relação inversa entre GDP e H:L, visto que a razão entre heterófilos e linfócitos reflete um estado de estresse crônico, embora não seja um parâmetro de alta sensibilidade. Também por isso, a manipulação dos animais e os procedimentos envolvidos não foram suficientes para alterá-lo no presente estudo. A presença isolada de heterofilia e linfopenia é, por sua vez, um parâmetro mais estabelecido para descrever o estresse crônico (HECKERT

et al., 2002; FELDMAN *et al.*, 2006). Esse parâmetro (H:L) foi caracterizado inicialmente em aves com a experimentação com uso de hormônios tipicamente ligados ao estresse (PUVADOLPIROD e THAXTON, 2000). Fisiologicamente, os glicocorticoides mobilizam recursos das reservas do organismo e os redirecionam para outras vias, para que seja possível uma resposta de “correr ou lutar”. Entretanto, o cortisol também é responsável por suprimir a atividade imune, sendo capaz de reduzir a bursa de Fabrícius (NORTON e WIRA, 1977; MALHEIROS *et al.*, 2003). De fato, foi verificado uma ligação negativa entre o tamanho da Bursa e a razão H:L (Resultados, Seção 4.6). Ambos os parâmetros seriam ligados aos níveis de estresse, mas em razões inversas (HECKERT *et al.*, 2002). Mais especificamente, os corticóides aumentam a porcentagem de heterófilos e reduzem a quantidade de linfócitos. Assim, a proporção H:L parece acompanhar a quantidade circulante desse hormônio (DAVIS *et al.*, 2008). Bayyari e colaboradores (1997) mostraram que aves com maior capacidade de crescimento apresentavam também uma maior relação H:L. A supressão da resposta imune pode estar envolvida no aumento de GDP verificado entre os animais com altas e baixas taxas H:L. Entretanto, o GDP pode se dever à maior deposição de gordura, ao invés de utilizar o carbono de glicose para a síntese de proteínas (MALHEIROS *et al.*, 2003). Estes autores ligaram os níveis de cortisol com menor produtividade.

5.4.3 Capacidade Hemolítica e Hemaglutinante e quantidade plasmática de IgY

A capacidade de hemólise e hemaglutinação do plasma dos galos e galinhas foram aferidas com o propósito de que auxiliasse a explicar o quadro geral da situação imune desses animais, e que se pudesse compreender como os parâmetros medidos por citometria de fluxo encaixam-se nesse quadro.

A redução da atividade hemolítica no plasma dos frangos reflete uma situação de maior debilidade imunológica. A seleção de aves mais aptas imunologicamente – cuja capacidade foi medida por outros métodos que não a atividade hemolítica – leva consigo a um aumento intrínseco da quantidade de proteína C3, ligada ao complemento, e a um consumo diferenciado da mesma. Por isso, foi sugerido que os parâmetros imunes estão geneticamente ligados (PARMENTIER *et al.*, 2002). Aves com maior capacidade produtiva (ovipostura) têm menos complemento capaz de fazer hemólise (BAYYARI *et al.*, 1997). Realmente, os

dados aqui obtidos confirmam a literatura. As aves que apresentaram maior capacidade de GDP possuíam menor atividade hemolítica (Figura 27).

A hemaglutinação e a quantificação de IgY plasmático total não acompanharam o padrão da hemólise (Resultados, Seção 4.6). Anticorpos naturais (Nac) são anticorpos capazes de se ligarem a antígenos pelos quais os animais nunca haviam sido imunizados. Esses anticorpos também estão ligados proporcionalmente a melhor ou pior capacidade imune de um modo geral, estando mais presente em aves que têm melhor capacidade de resposta contra um patógeno. Por isso, já foi sugerido que o método fosse utilizado para avaliar a capacidade imunológica como um todo (PARMENTIER *et al.*, 2004). Como o resultado da aglutinação por Nacs não demonstrou um padrão compreensível (dados não mostrados), IgY plasmático total foi quantificado por Western Blotting, com a finalidade de confirmar ou refutar o resultado anterior. Concentrações altas de IgY total já havia sido correlacionada com pior produtividade (CHENG *et al.*, 2001), o que vai de acordo com os resultados de hemólise. Ambos os parâmetros de aferição de anticorpos apresentam o mesmo padrão de resultados, e, portanto, a quantidade de IgY e a capacidade hemaglutinante seguem a mesma tendência, permanecendo desassociadas da hemólise. Acredita-se que a presença de Nacs não é alterada com a presença de antígenos – é uma resposta imune constitutiva inata. As respostas induzidas são sabidamente mais custosas metabolicamente (OCHSENBEIN e ZINKERNAGEL, 2000; BUEHLER, 2008). O sistema complemento, por sua vez, pode atuar na resposta constitutiva, através dos Nacs, ou da resposta adaptativa, com anticorpos induzidos; ainda tem a função de servir como uma ponte entre os dois tipos de resposta imune, organizando o destino de antígenos dentro dos tecidos linfoides (OCHSENBEIN e ZINKERNAGEL, 2000). Os resultados do trabalho atual confirmam que a resposta adaptativa, não dependente de Nacs, é a predominante a influenciar a capacidade de GDP.

5.4.4 Tamanho da Bursa

A bursa de Fabrícius é um órgão linfoide primário de aves (MUELLER *et al.*, 1962; MCCORMACK *et al.*, 1989), cujas proporções têm sido utilizadas extensivamente na literatura veterinária como um modo de aferir a capacidade imunológica dos animais (BAYYARI *et al.*, 1997; HECKERT *et al.*, 2002; CHEEMA *et*

al., 2003). A Bursa de aves com maior capacidade de ovipostura têm um tamanho menor em relação à massa corporal (BAYYARI *et al.*, 1997).

A mensuração da Bursa de Fabrícius no presente trabalho foi realizada com o objetivo de permitir comparações com outros parâmetros. Correlações positivas foram encontradas entre a Bursa de Fabrícius e a quantidade (porcentagem) de linfócitos B circulantes nas medidas feitas até a primeira semana de vida. Não houve correlação entre as Bursas coletadas no dia 44 e a proporção de linfócitos B (Figura 29).

A Bursa aumenta de tamanho, em relação ao peso corporal, até a terceira semana de vida, a partir de quando passa a sofrer involução (BELLAMY e MOHAMED, 1982). Agamaglobulinemia não se instala em aves que sofrem bursectomia a partir do primeiro dia de vida. O *pool* de linfócitos B circulantes pode ser alterado pela época em que a Bursa é removida experimentalmente, e é mais afetado quando a Bursa é retirada na época embrionária (KINCADE *et al.*, 1973). Esses dados podem explicar a ausência correlação entre tamanho da Bursa de Fabrícius e a porcentagem de linfócitos B circulantes verificada na segunda coleta, que foi feita no 44º dia de vida dos animais (Figura 29).

5.5 CONSIDERAÇÕES ESPECIAIS SOBRE ALGUNS PARÂMETROS CITOMÉTRICOS

5.5.1 $CD8^+CD28^-$ e CD4:CD8 nas situações de infecção experimental e perfil de risco imune

Dentre os parâmetros encontrados por diversos grupos ligados à imunossenescência, a proporção de linfócitos T $CD8^+CD28^-$ aparece constantemente elevada (OLSSON *et al.*, 2001; PAWELEC *et al.*, 2004). De acordo com esses autores, esse aumento é consequência da infecção persistente dos indivíduos com citomegalovírus (CMV). A demanda imunológica constante exigida pela infecção gera esta subpopulação de linfócitos que perdem a expressão de CD28 e tornam-se senescentes. Estes linfócitos são específicos para CMV, o que implica que quando grandes proporções circulantes destas células estão presentes, respostas a novos antígenos serão comprometidas (PAPAGNO *et al.*, 2004; PAWELEC *et al.*, 2004).

Ao final das coletas de galos infectados por IBV, no dia 45 pós-infecção, quase 12% de todas as células $CD8\alpha^+$ desses animais apresentavam o fenótipo de senescência (Figura 14), específicos para um único antígeno, e estavam fadadas a serem eliminadas da circulação. Pawelec e colegas (2004, 2002) sugerem que a manutenção alta dos níveis dessa subpopulação específica em humanos – causada por infecção subclínica persistente – seja responsável por níveis aumentados de mortalidade.

Nas infecções experimentais de aves SPF, também houve aumento consistente na proporção de linfócitos T citotóxicos senescentes ($CD28^-$). Para três dos quatro grupos de infecções houve aumento estatisticamente significativo na proporção dessas células (Figura 10) e inclusive para o grupo infectado por *Eimeria* observou-se a tendência de aumento. Nestas situações de infecção, que incluiu outro desafio pelo vírus da Bronquite Infecciosa (IBV), a porcentagem de células com o fenótipo senescente chegou a 15% dentro de uma semana de infecção. O número de células que ainda expressam o marcador CD28 seguiu tendência contrária, e estava reduzido durante as infecções.

A razão CD4:CD8 não é facilmente alterada por situações de desafio em galinhas. Junto com o marcador $CD8^+CD28^-$, e ainda outros, formam o que se denomina de fenótipo de risco imune. Pessoas portadoras desse perfil têm uma chance 2,5 vezes maior de falecer na sequência do estudo do que os não portadores (WIKBY *et al.*, 2005). No atual trabalho, a razão CD4:CD8 encontrou-se reduzida entre galinhas SPF e apresentou tendência de redução em aves infectadas por *Salmonella*. Em ambas as situações, a perda da capacidade imunológica pode determinar maior risco de mortalidade, embora isso não tenha sido avaliado aqui. Para aves SPF, uma razão reduzida pode influenciar positivamente na produtividade, mas demonstra incapacidade imune e provável menor resistência a desafios microbianos.

A presença e consistência desse marcador de senescência imunológica nas situações de infecção experimental, e a comparação entre os dados obtidos no presente estudo e os dados da literatura, sugerem que esse parâmetro indica também “envelhecimento” imune dos animais afetados.

5.5.2 CD8αα, $CD4^+CD8^+$, $CD28^-$ e TCRVβ1

Embora não seja o objetivo deste trabalho elucidar a imunobiologia de subpopulações de linfócitos, chama a atenção, neste trabalho, ao longo de diversos experimentos, a conexão entre as marcações CD8αα, $CD4^+CD8^+$, $CD28^-$ e TCRVβ1. O entendimento da correlação ou não entre esses receptores influi na interpretação dos resultados obtidos, e auxilia na explicação de alguns fenômenos observados.

As células CD8αα são as $CD8\alpha^+CD8\beta^-$, conforme a marcação no citômetro. Os receptores CD8 são compostos de um dímero de moléculas α e β (CHAN *et al.*, 1988), portanto, são CD8αα ou CD8αβ. A grande maioria dos linfócitos T em aves são do tipo CD8αβ (TREGASKES *et al.*, 1995). As células duplo-positivas ($CD4^+CD8^+$) expressam a molécula CD8αα (LUHTALA *et al.*, 1997a). Esse dado foi confirmado nos experimentos feitos aqui (Figura 11). A função das células CD8αα é controversa, sendo considerada repressora de TCR (CHEROUTRE e LAMBOLEZ, 2008), restritas tanto por MHC I quanto MHC II (ao contrário de CD8αβ, que são restritos por MHC I) (LEISHMAN *et al.*, 2002). Grande parte das células CD8αα no intestino de galinhas é derivada no timo, e adquirem a expressão desse receptor homodimérico ao chegarem no epitélio intestinal, mas não todas as células (IMHOF *et al.*, 2000). As células duplo-positivas ($CD4^+CD8^+$) já foram implicadas na resposta na coccidiose, e provavelmente são capazes de produzir interferon gama. Outros autores (SULLIVAN *et al.*, 2001) sugerem que essas células são um fenótipo ativado de linfócitos T citotóxico ($CD8^+$) enquanto Saalmuller e colaboradores (2002) indicam que, em porcinos, elas são um fenótipo ativado de linfócitos T auxiliares ($CD4^+$). As células $TCRV\beta1^+$, por sua vez, já foram descritas na literatura como sendo capazes de elicitar respostas típicas tanto de células T citotóxicas quanto de células T auxiliares (CIHAK *et al.*, 1991).

Quando se correlacionam os resultados de $CD4^+TCRV\beta1^+$ e $CD8\alpha^+CD8\beta^-$, interpretados juntos com os resultados obtidos no experimento de infecção das aves SPF com $CD4^+TCRV\beta1^+$ e $CD4^+CD8\alpha^+$ (Figura 31), pode-se supor que a proposição de Saalmuller e colegas (2002)(SAALMULLER *et al.*, 2002) está correta, quanto à função dos linfócitos denominados duplo-marcados ($CD4^+CD8^+$). Estes autores sugeriram que os linfócitos duplo-marcados são essencialmente linfócitos T auxiliares que já foram ativados. Sabe-se que são sempre células $CD4^+CD8\alpha^+$ (portanto, nunca são $CD4^+CD8\beta^+$). Em ambos os experimentos, associam-se

fortemente à linfócitos TCRVβ1$^+$, seja ele duplamente marcado com CD4 ou CD8 (Figura 31). Como já citado, os linfócitos TCRVβ1$^+$ têm importante função na mucosa, onde são auxiliares (T_{helper}) na produção de IgA (CIHAK *et al.*, 1991). Para tal, é necessário que tenham sido já ativados em um órgão linfoide secundário. Conforme já foi proposto (SAALMULLER *et al.*, 2002) os nossos dados de TCRVβ1$^+$ também apresentam tendência de correlação positiva com a presença de MHC II (não ligado a macrófagos, ou seja MHC II$^+$Macrófago$^-$) (correlação = 0,35, n = 60). A resposta a bactérias intestinais é capaz de levar a um aumento na presença de células CD8αα no intestino (KANEKO *et al.*, 2004).

A redução da expressão de CD28 não ocorre apenas nos linfócitos T CD8α (ver ponto 5.5.1), mas também é verificada na população de CD4$^+$TCRVβ1$^+$, e esta é também um marcador de imunossencência (PAWELEC *et al.*, 1996). Como já indicado na discussão sobre CD4$^+$TCRVβ1$^+$, os resultados deste trabalho, analisados sob a luz da literatura recente sobre imunologia aviária comprova que parte da população de linfócitos CD8αα é também positivo para CD4, e sugere que uma porcentagem destes sejam também TCRVβ1$^+$. Essa hipótese é levantada baseando-se em correlações entre as marcações, visto que não foram realizadas marcações triplas que demonstrassem as populações CD4$^+$CD8α$^+$TCRVβ1$^+$. Utilizando-se esse critério, pode-se supor, portanto, que parte da população CD4$^+$TCRVβ1$^+$ esteja também representada quando se analisa por citometria as células CD8α$^+$CD28$^-$. Novamente, esta inferência advém de ligação estatística entre eles, embora não se tenha marcações quádruplas CD4$^+$CD8α$^+$TCRVβ1$^+$CD28$^-$. De fato, há correlação estatística entre ambos os dados, embora se presuma que a maior parte dos linfócitos T CD8α$^+$CD28$^-$ sejam portadores de um receptor TCRVβ2$^+$, e não TCRVβ1$^+$ (Figura 30). Através do experimento de infecções das aves SPF, foi detectado até 34% de aves CD8α$^+$TCRVβ1$^+$, enquanto a população CD8α$^-$TCRVβ1$^+$ é cerca de 3 vezes menor. Linfócitos intestinais sabidamente expressam CD8αα com receptores TCRαβ (GANGADHARAN e CHEROUTRE, 2004). Dessa correlação entre os dados, seria presumível que a população CD8α$^+$CD28$^-$ também deva ser incluída no fenótipo de risco para baixo ganho de peso, ou ao menos incluído em sua interpretação. Embora essa marcação não tenha sido capaz de se correlacionar com GDP neste trabalho, é possível que se relacione em situações em que desafios infecciosos estejam presentes, como também já foi discutido anteriormente.

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho, foram avaliadas diversas subpopulações circulantes do sistema imune de frangos. As diferentes abordagens tiveram o intuito de compreender a dinâmica desses grupos celulares em diversas situações, de desafio ou higidez. Os resultados mais relevantes obtidos podem ser resumidos em:

1) Os anticoagulantes padronizados para uso em citometria de fluxo foram o EDTA e a heparina. A temperatura de 4^{o}C foi a mais utilizada, embora não tenha se demonstrado grandes diferenças em relação à temperatura ambiente (21^{o}C). Um transporte turbulento também não afeta os resultados obtidos na citometria de fluxo de leucócitos circulantes de frangos.
2) Diversos parâmetros apresentam flutuações dependentes da idade do animal. Os mais relevantes foram CD4, CD8α, CD8α^{bright}, TCRVβ1, CD28 e MHC II^{bright}.
3) Os parâmetros de células como CD8α^{+}CD28^{-} e CD8α^{+}CD8β^{-} e CD4^{+}CD8^{+} são bastante consistentes em se mostrarem alterados durante as diversas infecções, indicando saída de células da circulação para o local de infecção ou ativação pós desafio. As células CD8+TCRVβ1+ estão reduzidas na fase aguda das doenças virais (IBV e IBDV), retornando aos níveis do controle nas fases seguintes. A infecção por *Salmonella enteritidis* parece ser mais influente sobre a razão CD4:CD8, reduzindo-a. A infecção por *Eimeria* spp. foi a que demonstrou a menor influência sobre o sistema imune, provavelmente devido à fase da infecção em que as medidas foram feitas (dia 7 pi), quando a resposta deve estar em período de transição.

   A ativação excessiva de células CD8^{+} induz uma situação de senescência imunológica, onde a resposta a novos antígenos provavelmente está prejudicada. Outros subgrupos também auxiliam na interpretação da resposta a cada antígeno estudado;
4) CD4^{+}TCRVβ1^{+} e CD4:CD8, em conjunto, são capazes de se correlacionarem negativamente com a capacidade de ganho de peso dos animais, o que pôde ser explicado com o auxílio de outros testes como uma troca (*trade-off*) entre o sistema imune e a capacidade produtiva, para a qual os animais são selecionados – neste trabalho, essa combinação de características imunológicas foi denominada de Fenótipo Imune de Risco para Baixo GDP. O risco de baixo GDP

conferido pelo Fenótipo Imune de Risco é de 1,51 vezes maior do que para as aves que não estão com esse Fenótipo (quando consideradas as porcentagens de células) ou de 2,87 vezes (quando considerada a quantidade absoluta de células circulantes). Os resultados da atividade do sistema complemento e das medidas da bursa de Fabrícius corroboram a tese de trocas metabólicas entre sistema imune e capacidade produtiva. A citometria de fluxo das células imunes circulantes foi capaz de refletir a situação global do sistema imunológico.

Estes resultados em conjunto são um caminho inicial sobre o uso da citometria de fluxo em aves, que permitem ponderar sobre o futuro uso prático da metodologia em estudos sobre produção animal ou em ensaios clínicos.

7 BIBLIOGRAFIA

ASHEG, A. A.; LEVKUT, M.; REVAJOVÁ, V.; ·EVÂÍKOVÁ, Z.; KOLODZIEYSKI, L.; PISTL, J. Dynamics of lymphocyte subpopulations in immune organs of chickens infected with *Salmonella enteritidis*. **Acta Veterinaria Brunensis**, v.72, p.359-364, 2003.

BALAMURUGAN, V.; KATARIA, J. M. Economically important non-oncogenic immunosuppressive viral diseases of chicken - current status. **Veterinary Research Communications**, v.30, n.5, p.541-566, 2006.

BARNETT, D.; WALKER, B.; LANDAY, A.; DENNY, T. N. CD4 immunophenotyping in HIV infection. **Nature Reviews Microbiology**, v.6, n.11 Suppl, p.S7-15, 2008.

BARUA, A.; YOSHIMURA, Y. Ovarian cell-mediated immune response to *Salmonella enteritidis* infection in laying hens (*Gallus domesticus*). **Poultry Science**, v.83, n.6, p.997-1002, 2004.

BAYYARI, G. R.; HUFF, W. E.; RATH, N. C.; BALOG, J. M.; NEWBERRY, L. A.; VILLINES, J. D.; SKEELES, J. K.; ANTHONY, N. B.; NESTOR, K. E. Effect of the genetic selection of turkeys for increased body weight and egg production on immune and physiological responses. **Poultry Science**, v.76, n.2, p.289-296, 1997.

BELLAMY, D.; MOHAMED, K. A comparative study of age involution of the bursa of Fabricius an thymus in birds. **Thymus**, v.4, n.2, p.107-114, 1982.

BERNDT, A.; PIEPER, J.; METHNER, U. Circulating gamma delta T cells in response to *Salmonella enterica* serovar enteritidis exposure in chickens. **Infection and Immunity**, v.74, n.7, p.3967-3978, 2006.

BESSAY, M.; LE VERN, Y.; KERBOEUF, D.; YVORE, P.; QUERE, P. Changes in intestinal intra-epithelial and systemic T-cell subpopulations after an *Eimeria* infection in chickens: comparative study between *E acervulina* and *E tenella*. **Veterinary Research**, v.27, n.4-5, p.503-514, 1996.

BOHLS, R. L.; SMITH, R.; FERRO, P. J.; SILVY, N. J.; LI, Z.; COLLISSON, E. W. The use of flow cytometry to discriminate avian lymphocytes from contaminating thrombocytes. **Developmental & Comparative Immunology**, v.30, n.9, p.843-850, 2006.

BOLIS, D.; PAGANINI, F.; SIMON, V.; ZUANAZE, M.; NETO, H. S.; CORREA, A.; ITO, N. Gumboro Disease: Evaluation of serological and anatomopathological responses in vaccinated broiler chickens challenged with very virulent virus strain. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.5, n.2, p.137 - 146, 2003.

BRASIL. MAPA. **Instrução normativa 07/2006**. Brasília/DF, 2006.

BREED, D. G.; DORRESTEIN, J.; VERMEULEN, A. N. Immunity to *Eimeria tenella* in chickens: phenotypical and functional changes in peripheral blood T-cell subsets. **Avian Diseases**, v.40, n.1, p.37-48, 1996.

BREED, D. G. J.; SCHETTERS, T. P. M.; VERHOEVEN, N. A. P.; VERMEULEN, A. N. Characterization of phenotype related responsiveness of peripheral blood lymphocytes from *Eimeria tenella* infected chickens. **Parasite Immunology**, v.19, n.12, p.563-569, 1997.

BRIDLE, B. W.; JULIAN, R.; SHEWEN, P. E.; VAILLANCOURT, J. P.; KAUSHIK, A. K. T lymphocyte subpopulations diverge in commercially raised chickens. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.70, n.3, p.183-190, 2006.

BUCY, R.; CHEN, C.; CIHAK, J.; LOSCH, U.; COOPER, M. Avian T cells expressing gamma delta receptors localize in the splenic sinusoids and the intestinal epithelium. **The Journal of Immunology**, v.141, n.7, p.2200-2205, 1988.

BUEHLER, D. M. **Bottlenecks, budgets and immunity: the costs and benefits of immune function over the annual cycle of red knots (*Calidris canutus*)**. 248. Tese (Doutorado) - Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Groningen, Groningen, 2008.

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Veterinary Research**, v.38, n.2, p.281-297, 2007.

CAVANAGH, D.; CASAIS, R.; ARMESTO, M.; HODGSON, T.; IZADKHASTI, S.; DAVIES, M.; LIN, F.; TARPEY, I.; BRITTON, P. Manipulation of the infectious bronchitis coronavirus genome for vaccine development and analysis of the accessory proteins. **Vaccine**, v.25, n.30, p.5558-5562, 2007.

CEBRA, J. J. Influences of microbiota on intestinal immune system development. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.69, n.5, p.1046S-1051S, 1999.

CHAN, M. M.; CHEN, C. L.; AGER, L. L.; COOPER, M. D. Identification of the avian homologues of mammalian CD4 and CD8 antigens. **The Journal of Immunology**, v.140, n.7, p.2133-2138, 1988.

CHAR, D.; SANCHEZ, P.; CHEN, C. L.; BUCY, R. P.; COOPER, M. D. A third sublineage of avian T cells can be identified with a T cell receptor-3-specific antibody. **The Journal of Immunology**, v.145, n.11, p.3547-3555, 1990.

CHEEMA, M. A.; QURESHI, M. A.; HAVENSTEIN, G. B. A comparison of the immune response of a 2001 commercial broiler with a 1957 randombred broiler strain when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. **Poultry Science**, v.82, n.10, p.1519-1529, 2003.

CHEESEMAN, J. H.; KAISER, M. G.; LAMONT, S. J. Genetic line effect on peripheral blood leukocyte cell surface marker expression in chickens. **Poultry Science**, v.83, n.6, p.911-916, 2004.

CHENG, H. W.; EICHER, S. D.; CHEN, Y.; SINGLETON, P.; MUIRT, W. M. Effect of genetic selection for group productivity and longevity on immunological and hematological parameters of chickens. **Poultry Science**, v.80, n.8, p.1079-1086, 2001.

CHEROUTRE, H.; LAMBOLEZ, F. Doubting the TCR coreceptor function of CD8alphaalpha. **Immunity**, v.28, n.2, p.149-159, 2008.

CHOI, K. D.; LILLEHOJ, H. S.; ZALENGA, D. S. Changes in local IFN-[gamma] and TGF-[beta]4 mRNA expression and intraepithelial lymphocytes following *Eimeria acervulina* infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.71, n.3-4, p.263-275, 1999a.

CHOI, K. D.; LILLEHOJ, H. S.; ZALENGA, D. S. Changes in local IFN-gamma and TGF-beta4 mRNA expression and intraepithelial lymphocytes following *Eimeria acervulina* infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.71, n.3-4, p.263-275, 1999b.

CHOWDHURY, SR; SMITH, T.; BOERMANS, H.; WOODWARD, B. Effects of feed-borne *Fusarium* mycotoxins on hematology and immunology of laying hens. **Poultry Science**, v.84, n.12, p.1841-1850, 2005a.

CHOWDHURY, S. R.; SMITH, T. K.; BOERMANS, H. J.; WOODWARD, B. Effects of feed-borne *Fusarium* mycotoxins on hematology and immunology of laying hens. **Poultry Science**, v.84, n.12, p.1841-1850, 2005b.

CHOWDHURY, S. R.; SMITH, T. K.; BOERMANS, H. J.; WOODWARD, B. Effects of feed-borne *Fusarium* mycotoxins on hematology and immunology of turkeys. **Poultry Science**, v.84, n.11, p.1698-1706, 2005c.

CIHAK, J.; HOFFMANN-FEZER, G.; ZIEGLER-HEIBROCK, H. W.; STEIN, H.; KASPERS, B.; CHEN, C. H.; COOPER, M. D.; LOSCH, U. T cells expressing the V beta 1 T-cell receptor are required for IgA production in the chicken. **Proceedings of the National Acadademy of Sciences of the USA**, v.88, n.23, p.10951-10955, 1991.

CIHAK, J.; LOSCH, U.; HOFFMANN-FEZER, G.; CHEN, C. H.; COOPER, M. D.; ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. In vivo depletion of chicken T-cell subsets. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.38, n.2, p.123-129, 1993.

COLLISSON, E. W.; PEI, J.; DZIELAWA, J.; SEO, S. H. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry. **Developmental & Comparative Immunology**, v.24, n.2-3, p.187-200, 2000.

CORLEY, M. M.; GIAMBRONE, J. J. Immunosuppression in specific-pathogen-free broilers administered infectious bursal disease virus vaccines by in ovo route. **Avian Diseases**, v.46, n.4, p.810-815, 2002.

DAVIS, A. K.; MANEY, D. L.; MAERZ, J. C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. **Functional Ecology**, v.22, n.5, p.760-772, 2008.

DAVISON, F. K., B.; SCHAT, K.A. . **Avian Immunology**. 1. Academic Press, 2008.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D.; KNIGHT, C. D. Microbial imprinting in gut development and health. **The Journal of Applied Poultry Research**, v.17, n.1, p.174-188, 2008.

DIETERT, R. R.; GOLEMBOSKI, K. A.; AUSTIC, R. E. Environment-immune interactions. **Poultry Science**, v.73, n.7, p.1062-1076, 1994.

EKONG, T.; HILL, A. M.; GOMPELS, M.; BROWN, A.; PINCHING, A. J. The effect of the temperature and duration of sample storage on the measurement of lymphocyte subpopulations from HIV-1-positive and control subjects. **Journal of Immunological Methods**, v.151, n.1-2, p.217-225, 1992.

EKONG, T.; KUPEK, E.; HILL, A.; CLARK, C.; DAVIES, A.; PINCHING, A. Technical influences on immunophenotyping by flow cytometry. The effect of time and temperature of storage on the viability of lymphocyte subsets. **Journal of Immunological Methods**, v.164, n.2, p.263-273, 1993.

ENESTRÖM, S.; HED, J.; HULTMAN, P. Detection of immune deposits in glomeruli: A comparative study of paraffin-embedded, enzyme-treated sections and cryostat sections as substrates in immunofluorescence. **Journal of Immunological Methods**, v.37, n.3-4, p.343-351, 1980.

ERF, G. F. Cell-mediated immunity in poultry. **Poultry Science**, v.83, n.4, p.580-590, 2004.

ERF, G. F.; BOTTJE, W. G.; BERSI, T. K. CD4, CD8 and TCR defined T-cell subsets in thymus and spleen of 2- and 7-week old commercial broiler chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.62, n.4, p.339-348, 1998.

EWALD, S. J.; LIEN, Y. Y.; LI, L.; JOHNSON, L. W. B-haplotype control of CD4/CD8 subsets and TCR V beta usage in chicken T lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.53, n.3-4, p.285-301, 1996.

FAIR, J. M.; TAYLOR-MCCABE, K. J.; SHOU, Y.; MARRONE, B. L. Immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocyte subpopulations: individual variability and repeatability. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.125, n.3-4, p.268-273, 2008.

FAO - FAO. **A basic laboratory manual for the small scale production and testing of I-2 Newcastle Disease Vaccine.** FAO, 2002.

FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; SCHALM, O. W. **Schalm`s veterinary hematology**. 5. Iowa:Wiley-Blackwell, 2006.

FERGUSON, F. G.; WIKBY, A.; MAXSON, P.; OLSSON, J.; JOHANSSON, B. Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: A comparison between survivors and nonsurvivors. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v.50A, n.6, p.B378-B382, 1995.

FLÔRES, M. L.; NASCIMENTO, V. P. D.; KADER, I. I. T. A.; CARDOSO, M.; SANTOS, L. R. D.; LOPES, R. F. F.; WALD, V. B.; BARBOSA, T. M. C. Análise da contaminação por *Salmonella* em ovos do tipo colonial através da reação em cadeia da polimerase. **Ciência Rural**, v.33, n.3, p.553-557, 2003.

GANGADHARAN, D.; CHEROUTRE, H. The CD8 isoform CD8alphaalpha is not a functional homologue of the TCR co-receptor CD8alphabeta. **Current Opinion in Immunology**, v.16, n.3, p.264-270, 2004.

GILMOUR, D. G.; BRAND, A.; DONNELLY, N.; STONE, H. A. Bu-1 and Th-1, two loci determining surface antigens of B or T lymphocytes in the chicken. **Immunogenetics**, v.3, n.1, p.549-563, 1976.

GIMENO, I. M.; WITTER, R. L.; HUNT, H. D.; REDDY, S. M.; REED, W. M. Biocharacteristics shared by highly protective vaccines against Marek's disease. **Avian Pathology**, v.33, n.1, p.59-68, 2004.

GIRISH, C. K.; SMITH, T. K. Impact of feed-borne mycotoxins on avian cell-mediated and humoral immune responses. **World Mycotoxin Journal**, v.1, n.2, p.105-121, 2008.

GUIMARÃES, L. D.; MORAES, A. N. D. Anestesia em aves: agentes anestésicos. **Ciência Rural**, v.30, p.1073-1081, 2000.

HALA, K.; BOYD, R.; WICK, G. Chicken major histocompatibility complex and disease. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.14, n.6, p.607-616, 1981.

HAVENSTEIN, G. B.; FERKET, P. R.; SCHEIDELER, S. E.; RIVES, D. V. Carcass composition and yield of 1991 vs 1957 broilers when fed "typical" 1957 and 1991 broiler diets. **Poultry Science**, v.73, n.12, p.1795-1804, 1994.

HECKERT, R.; ESTEVEZ, I.; RUSSEK-COHEN, E.; PETTIT-RILEY, R. Effects of density and perch availability on the immune status of broilers. **Poultry Science**, v.81, n.4, p.451-457, 2002.

HOFSTAD, M. S. Cross-immunity in chickens using seven isolates of avian infectious bronchitis virus. **Avian Diseases**, v.25, n.3, p.650-654, 1981.

HOLT, P. S.; VAUGHN, L. E.; GAST, R. K. Flow cytometric characterization of Peyer's patch and cecal tonsil T lymphocytes in laying hens following challenge with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.133, n.2-4, p.276-281, 2010.

HUNT, H. D.; LUPIANI, B.; MILLER, M. M.; GIMENO, I.; LEE, L. F.; PARCELLS, M. S. Marek's disease virus down-regulates surface expression of MHC (B Complex) Class I (BF) glycoproteins during active but not latent infection of chicken cells. **Virology**, v.282, n.1, p.198-205, 2001.

IMHOF, B. A.; DUNON, D.; COURTOIS, D.; LUHTALA, M.; VAINIO, O. Intestinal CD8aa and CD8ab intraepithelial lymphocytes are thymus derived and exhibit subtle differences in TCRb repertoires. **The Journal of Immunology**, v.165, n.12, p.6716-6722, 2000.

JUUL-MADSEN, H. R.; NIELSEN, O. L.; KROGH-MAIBOM, T.; RONTVED, C. M.; DALGAARD, T. S.; BUMSTEAD, N.; JORGENSEN, P. H. Major histocompatibility complex-linked immune response of young chickens vaccinated with an attenuated live infectious bursal disease virus vaccine followed by an infection. **Poultry Science**, v.81, n.5, p.649-656, 2002.

KAISER, P.; ROTHWELL, L.; GALYOV, E. E.; BARROW, P. A.; BURNSIDE, J.; WIGLEY, P. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella gallinarum*. **Microbiology**, v.146 Pt 12, p.3217-3226, 2000.

KAMALAVENKATESH, P.; VAIRAMUTHU, S.; BALACHANDRAN, C.; MANOHAR, B. M.; RAJ, G. D. Immunopathological effect of the mycotoxins cyclopiazonic acid and T-2 toxin on broiler chicken. **Mycopathologia**, v.159, n.2, p.273-279, 2005.

KANEKO, M.; MIZUNUMA, T.; TAKIMOTO, H.; KUMAZAWA, Y. Development of TCR alpha beta CD8 alpha alpha intestinal intraepithelial lymphocytes is promoted by interleukin-15-producing epithelial cells constitutively stimulated by gram-negative bacteria via TLR4. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.27, n.6, p.883-889, 2004.

KAUFMAN, J.; MILNE, S.; GOBEL, T. W.; WALKER, B. A.; JACOB, J. P.; AUFFRAY, C.; ZOOROB, R.; BECK, S. The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex. **Nature**, v.401, n.6756, p.923-925, 1999.

KERR, C. L.; HAMMERSTEDT, R. H.; BARBATO, G. F. Effects of selection for exponential growth rate at different ages on reproduction in chickens. **Avian and Poultry Biology Reviews**, v.12, p.127-136, 2001.

KINCADE, P. W.; SELF, K. S.; COOPER, M. D. Survival and function of bursa-derived cells in bursectomized chickens. **Cellular Immunology**, v.8, n.1, p.93-102, 1973.

LAHTI, J. M.; CHEN, C. L.; TJOELKER, L. W.; PICKEL, J. M.; SCHAT, K. A.; CALNEK, B. W.; THOMPSON, C. B.; COOPER, M. D. Two distinct alpha beta T-cell lineages can be distinguished by the differential usage of T-cell receptor V beta gene segments. **Proceedings of the National Acadademy of Sciences of the USA**, v.88, n.23, p.10956-10960, 1991.

LANGRISH, C. L.; BUDDLE, J. C.; THRASHER, A. J.; GOLDBLATT, D. Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses. **Clinical & Experimental Immunology**, v.128, n.1, p.118-123, 2002.

LEGGE, K. L.; BRACIALE, T. J. Accelerated migration of respiratory dendritic cells to the regional lymph nodes is limited to the early phase of pulmonary infection. **Immunity**, v.18, n.2, p.265-277, 2003.

LEISHMAN, A. J.; GAPIN, L.; CAPONE, M.; PALMER, E.; MACDONALD, H. R.; KRONENBERG, M.; CHEROUTRE, H. Precursors of functional MHC Class I- or Class II-restricted CD8[alpha][alpha]+ T cells are positively selected in the Thymus by agonist self-peptides. **Immunity**, v.16, n.3, p.355-364, 2002.

LI, Z.; NESTOR, K.; SAIF, Y.; LUHTALA, M. Flow cytometric analysis of T lymphocyte subpopulations in large-bodied turkey lines and a randombred control population. **Poultry Science**, v.79, n.2, p.219-223, 2000.

LILLEHOJ, H. **Imunologia em coccidiose aviária**. Simpósio Internacional sobre Coccidiose Aviária. Foz do Iguaçu: FACTA. 1999. 84 p.

LILLEHOJ, H. S.; MIN, W.; DALLOUL, R. A. Recent progress on the cytokine regulation of intestinal immune responses to *Eimeria*. **Poultry Science**, v.83, n.4, p.611-623, 2004.

LINSLEY, P. S.; LEDBETTER, J. A. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. **Annual Review of Immunology**, v.11, p.191-212, 1993.

LUHTALA, M.; LASSILA, O.; TOIVANEN, P.; VAINIO, O. A novel peripheral CD4+ CD8+ T cell population: inheritance of CD8alpha expression on CD4+ T cells. **European Journal of Immunology**, v.27, n.1, p.189-193, 1997a.

LUHTALA, M.; TREGASKES, C. A.; YOUNG, J. R.; VAINIO, O. Polymorphism of chicken CD8-alpha, but not CD8-beta. **Immunogenetics**, v.46, n.5, p.396-401, 1997b.

MACEY, M. **Flow cytometry principles and applications**. 1. Totowa:Humana press, 2007.

MALHEIROS, R.; MORAES, V.; COLLIN, A.; DECUYPERE, E.; BUYSE, J. Free diet selection by broilers as influenced by dietary macronutrient ratio and corticosterone supplementation. 1. Diet selection, organ weights, and plasma metabolites. **Poultry Science**, v.82, n.1, p.123-131, 2003.

MAST, J.; GODDEERIS, B. M. Development of immunocompetence of broiler chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.70, n.3-4, p.245-256, 1999.

MAST, J.; GODDEERIS, B. M.; PEETERS, K.; VANDESANDE, F.; BERGHMAN, L. R. Characterisation of chicken monocytes, macrophages and interdigitating cells by

the monoclonal antibody KUL01. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.61, n.2-4, p.343-357, 1998.

MATSON, K. D.; RICKLEFS, R. E.; KLASING, K. C. A hemolysis-hemagglutination assay for characterizing constitutive innate humoral immunity in wild and domestic birds. **Developmental & Comparative Immunology**, v.29, n.3, p.275-286, 2005.

MCCORMACK, W. T.; TJOELKER, L. W.; BARTH, C. F.; CARLSON, L. M.; PETRYNIAK, B.; HUMPHRIES, E. H.; THOMPSON, C. B. Selection for B cells with productive IgL gene rearrangements occurs in the bursa of Fabricius during chicken embryonic development. **Genes & Development**, v.3, n.6, p.838-847, 1989.

MCMICHAEL, A. J.; ROWLAND-JONES, S. L. Cellular immune responses to HIV. **Nature**, v.410, n.6831, p.980-987, 2001.

MENDONÇA, J. F. P.; MARTINS, N. R. D. S.; CARVALHO, L. B. D.; SÁ, M. E. P. D.; MELO, C. B. D. Bronquite infecciosa das galinhas: conhecimentos atuais, cepas e vacinas no Brasil. **Ciência Rural**, v.39, n.8, p.2559-2566, 2009.

MUELLER, A. P.; WOLFE, H. R.; MEYER, R. K.; ASPINALL, R. L. Further studies on the role of the bursa of Fabricius in antibody production. **The Journal of Immunology**, v.88, n.3, p.354-360, 1962.

NABESHIMA, S.; MURATA, M.; KIKUCHI, K.; IKEMATSU, H.; KASHIWAGI, S.; HAYASHI, J. A reduction in the number of peripheral CD28+CD8+T cells in the acute phase of influenza. **Clinical & Experimental Immunology**, v.128, n.2, p.339-346, 2002.

NAGARAJAN, M. M.; KIBENGE, F. S. Infectious bursal disease virus: a review of molecular basis for variations in antigenicity and virulence. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.61, n.2, p.81-88, 1997.

NASCIMENTO, V. P. D.; SANTOS, L. R. D. ***Salmonella*** **Enteritidis: Controle, implicações em saúde pública e na qualidade dos produtos de origem avícola**. VI Simpósio Brasil Sul de Avicultura. Chapecó: Embrapa Suínos e Aves. 2005. 124 p.

NESTOR, K. E.; ANDERSON, J. W.; VELLEMAN, S. G. Genetic variation in pure lines and crosses of large-bodied turkey lines. 2. Carcass traits and body shape. **Poultry Science**, v.80, n.8, p.1093-1104, 2001.

NESTOR, K. E.; NOBLE, D. O.; ZHU, N. J.; MORITSU, Y. Direct and correlated responses to long-term selection for increased body weight and egg production in turkeys. **Poultry Science**, v.75, n.10, p.1180-1191, 1996.

NICHOLSON, J. K.; GREEN, T. A. Selection of anticoagulants for lymphocyte immunophenotyping. Effect of specimen age on results. **Journal of Immunological Methods**, v.165, n.1, p.31-35, 1993.

NORDLING, D.; ANDERSSON, M.; ZOHARI, S.; GUSTAFSSON, L. Reproductive effort reduces specific immune response and parasite resistance. **Proceedings of the Royal Society of London**, v.265, n.1403, p.1291-1298, 1998.

NORTON, J. M.; WIRA, C. R. Dose-related effects of the sex hormones and cortisol on the growth of the bursa of Fabricius in chick embryos. **Journal of Steroid Biochemistry**, v.8, n.9, p.985-987, 1977.

OCHSENBEIN, A. F.; ZINKERNAGEL, R. M. Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. **Immunology Today**, v.21, n.12, p.624-630, 2000.

OLÁH, I.; VERVELDE, L. In:DAVISON, F.;KASPERS, B.;SCHAT, K. A. **Avian Immunology**. Academic Press, 2008.

OLSSON, J.; WIKBY, A.; JOHANSSON, B.; LÖFGREN, S.; NILSSON, B.-O.; FERGUSON, F. G. Age-related change in peripheral blood T-lymphocyte subpopulations and cytomegalovirus infection in the very old: the Swedish longitudinal OCTO immune study. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.121, n.1-3, p.187-201, 2001.

PAPAGNO, L.; SPINA, C. A.; MARCHANT, A.; SALIO, M.; RUFER, N.; LITTLE, S.; DONG, T.; CHESNEY, G.; WATERS, A.; EASTERBROOK, P.; DUNBAR, P. R.; SHEPHERD, D.; CERUNDOLO, V.; EMERY, V.; GRIFFITHS, P.; CONLON, C.; MCMICHAEL, A. J.; RICHMAN, D. D.; ROWLAND-JONES, S. L.; APPAY, V. Immune activation and CD8+ T-cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection. **Public Library of Science Biology**, v.2, n.2, p.E20, 2004.

PARMENTIER, H. K.; BAELMANS, R.; NIEUWLAND, M. G.; DORNY, P.; DEMEY, F. Haemolytic complement activity, C3 and Factor B consumption in serum from chickens divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.90, n.1-2, p.91-100, 2002.

PARMENTIER, H. K.; KREUKNIET, M. B.; GOEREE, B.; DAVISON, T. F.; JEURISSEN, S. H.; HARMSEN, E. G.; NIEUWLAND, M. G. Differences in distribution of lymphocyte antigens in chicken lines divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.48, n.1-2, p.155-168, 1995.

PARMENTIER, H. K.; LAMMERS, A.; HOEKMAN, J. J.; REILINGH, G. D. V.; ZAANEN, I. T. A.; SAVELKOUL, H. F. J. Different levels of natural antibodies in chickens divergently selected for specific antibody responses. **Developmental & Comparative Immunology**, v.28, n.1, p.39-49, 2004.

PAWELEC, G. Immunosenescence: impact in the young as well as the old? **Mechanisms of Ageing and Development**, v.108, n.1, p.1-7, 1999.

PAWELEC, G.; AKBAR, A.; CARUSO, C.; EFFROS, R.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B.; WIKBY, A. Is immunosenescence infectious? **Trends in Immunology**, v.25, n.8, p.406-410, 2004.

PAWELEC, G.; OUYANG, Q.; COLONNA-ROMANO, G.; CANDORE, G.; LIO, D.; CARUSO, C. Is human immunosenescence clinically relevant? Looking for 'immunological risk phenotypes'. **Trends in Immunology**, v.23, n.7, p.330-332, 2002.

PAWELEC, G.; SANSOM, D.; REHBEIN, A.; ADIBZADEH, M.; BECKMAN, I. Decreased proliferative capacity and increased susceptibility to activation-induced cell death in late-passage human CD4+ TCR2+ cultured T cell clones. **Experimental Gerontology**, v.31, n.6, p.655-668, 1996.

PEREIRA, M. G. **Epidemiologia Teoria e Prática**. 1. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2003.

PEROZO, F.; FERRER, J.; ALVARADO, M. Haematological values in broiler chicks during long time - Low level exposure to Afatoxin B-1 in Zulia State, Venezuela. **Revista Cientifca-Facultad de ciencias veterinarias**, v.13, n.1, p.59-64, 2003.

PETKOV, D. I.; LINNEMANN, E. G.; KAPCZYNSKI, D. R.; SELLERS, H. S. Identification and characterization of two distinct bursal B-cell subpopulations following infectious bursal disease virus infection of White Leghorn chickens. **Avian Diseases**, v.53, n.3, p.347-355, 2009.

PUVADOLPIROD, S.; THAXTON, J. P. Model of physiological stress in chickens 1. Response parameters. **Poultry Science**, v.79, n.3, p.363-369, 2000.

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

RAUW, W. M.; KANIS, E.; NOORDHUIZEN-STASSEN, E. N.; GROMMERS, F. J. Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. **Livestock Production Science**, v.56, n.1, p.15-33, 1998.

RAUW, W. M.; KNAP, P. W.; GOMEZ-RAYA, L.; VARONA, L.; NOGUERA, J. L. Reallocation of body resources in lactating mice highly selected for litter size. **Journal of Animal Science**, v.81, n.4, p.939-944, 2003.

RODENBERG, J.; SHARMA, J. M.; BELZER, S. W.; NORDGREN, R. M.; NAQI, S. Flow cytometric analysis of B cell and T cell subpopulations in specific-pathogen-free chickens infected with infectious bursal disease virus. **Avian Diseases**, v.38, n.1, p.16-21, 1994.

RUIZ, A. R.; FERNANDEZ, I. P.; PEREA BAENA, J. M.; DE LA TORRE, F. J.; RAMIREZ, G. R. Influence of sample storage time and temperature on lymphocyte subset counts using a FACScount system. **Haematologica**, v.85, n.5, p.550-551, 2000.

RUSSELL, P. H.; DWIVEDI, P. N.; DAVISON, T. F. The effects of cyclosporin A and cyclophosphamide on the populations of B and T cells and virus in the Harderian gland of chickens vaccinated with the Hitchner B1 strain of Newcastle disease virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.60, n.1-2, p.171-185, 1997.

SAALMULLER, A.; WERNER, T.; FACHINGER, V. T-helper cells from naive to committed. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.87, n.3-4, p.137-145, 2002.

SAHAR, M. O.; MAHASIN, A. S. A. A.; RAHMAN, E. A. Residual pathogenic effects of Infectious Bursal Disease Vaccines containing intermediate and hot strains of the Virus in broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, v.3, n.6, p.415-418, 2004.

SANTOS, H. F. D.; LOVATO, L. T.; FLÔRES, M. L.; TREVISO, I. M.; MAZZUTTI, K. C.; PAN, K. A. Anticorpos contra vírus em galinhas de terreiro do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p.1932-1937, 2008.

SCHAT, K. A.; CHEN, C. L.; CALNEK, B. W.; CHAR, D. Transformation of T-lymphocyte subsets by Marek's disease herpesvirus. **The Journal of Virology**, v.65, n.3, p.1408-1413, 1991.

SCHUTZ, K.; KERJE, S.; CARLBORG, O.; JACOBSSON, L.; ANDERSSON, L.; JENSEN, P. QTL analysis of a red junglefowl x White Leghorn intercross reveals trade-off in resource allocation between behavior and production traits. **Behaviour Genetics**, v.32, n.6, p.423-433, 2002.

SEO, S.; COLLISSON, E. Specific cytotoxic T lymphocytes are involved in in vivo clearance of infectious bronchitis virus. **The Journal of Virology**, v.71, n.7, p.5173-5177, 1997.

SHARMA, J. **Avian Cellular Immunology**. 1. CRC Press, 1990.

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.

SIWEK, M.; CORNELISSEN, S.; BUITENHUIS, A.; NIEUWLAND, M.; BOVENHUIS, H.; CROOIJMANS, R.; GROENEN, M.; PARMENTIER, H.; VAN DER POEL, J. Quantitative trait loci for body weight in layers differ from quantitative trait loci specific for antibody responses to sheep red blood cells. **Poultry Science**, v.83, n.6, p.853-859, 2004.

SMITH, A. L.; BEAL, R. K. In:DAVISON, T. F., KASPERS, B. AND SCHAT, K.A. . **Avian Immunology** Academic Press, 2008. 482.

STAMP DAWKINS, M.; DONNELLY, C. A.; JONES, T. A. Chicken welfare is influenced more by housing conditions than by stocking density. **Nature**, v.427, n.6972, p.342-344, 2004.

SULLIVAN, Y. B.; LANDAY, A. L.; ZACK, J. A.; KITCHEN, S. G.; AL-HARTHI, L. Upregulation of CD4 on CD8+ T cells: CD4dimCD8bright T cells constitute an activated phenotype of CD8+ T cells. **Immunology**, v.103, n.3, p.270-280, 2001.

SWAMY, H. V.; SMITH, T. K.; KARROW, N. A.; BOERMANS, H. J. Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on growth and immunological parameters of broiler chickens. **Poultry Science**, v.83, n.4, p.533-543, 2004.

TALEBI, A.; ASRI-REZAEI, S.; ROZEH-CHAI, R.; SAHRAEI, R. Comparative Studies on Haematological Values of Broiler Strains (Ross, Cobb, Arbor-acres and Arian). **International Journal of Poultry Science**, v.4, n.8, p.573-579, 2005.

THORNTHWAITE, J. T.; ROSENTHAL, P. K.; VAZQUEZ, D. A.; SECKINGER, D. The effects of anticoagulant and temperature on the measurements of helper and suppressor cells. **Diagnostic Immunology**, v.2, n.3, p.167-174, 1984.

TIMMS, L.; ALEXANDER, D. J. Cell-mediated immune response of chickens to Newcastle disease vaccines. **Avian Pathology**, v.6, n.1, p.51-59, 1977.

TREGASKES, C.; KONG, F.; PARAMITHIOTIS, E.; CHEN, C.; RATCLIFFE, M.; DAVISON, T.; YOUNG, J. Identification and analysis of the expression of CD8 alpha beta and CD8 alpha alpha isoforms in chickens reveals a major TCR-gamma delta CD8 alpha beta subset of intestinal intraepithelial lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v.154, n.9, p.4485-4494, 1995.

TSUJI, S.; CHAR, D.; BUCY, R. P.; SIMONSEN, M.; CHEN, C. H.; COOPER, M. D. Gamma delta T cells are secondary participants in acute graft-versus-host reactions initiated by CD4+ alpha beta T cells. **European Journal of Immunology**, v.26, n.2, p.420-427, 1996.

U.B.A. - União Brasileira de Avicultura. **Relatório Anual da União Brasileira de Avicultura**. BUSINESS, A. F., 2009.

UMESAKI, Y.; SETOYAMA, H.; MATSUMOTO, S.; OKADA, Y. Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. **Immunology**, v.79, n.1, p.32-37, 1993.

VAN DER WAAIJ, E. H. A resource allocation model describing consequences of artificial selection under metabolic stress. **Journal of Animal Science**, v.82, n.4, p.973-981, 2004.

VAN GINKEL, F. W.; VAN SANTEN, V. L.; GULLEY, S. L.; TORO, H. Infectious bronchitis virus in the chicken Harderian gland and lachrymal fluid: viral load, infectivity, immune cell responses, and effects of viral immunodeficiency. **Avian Diseases**, v.52, n.4, p.608-617, 2008.

VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; DE SMET, I.; MAST, J.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Dynamics of immune cell infiltration in the caecal lamina propria of chickens after neonatal infection with a *Salmonella* Enteritidis strain. **Developmental & Comparative Immunology**, v.26, n.4, p.355-364, 2002.

VINEY, J.; MACDONALD, T. T.; SPENCER, J. Gamma/delta T cells in the gut epithelium. **Gut**, v.31, n.8, p.841-844, 1990.

WIKBY, A.; FERGUSON, F.; FORSEY, R.; THOMPSON, J.; STRINDHALL, J.; LÃ¶FGREN, S.; NILSSON, B.-O.; ERNERUDH, J.; PAWELEC, G.; JOHANSSON, B. An Immune Risk Phenotype, cognitive impairment, and survival in very late life: impact of allostatic load in Swedish octogenarian and nonagenarian humans. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v.60, n.5, p.556-565, 2005.

WIKBY, A.; JOHANSSON, B.; FERGUSON, F.; OLSSON, J. Age-related changes in immune parameters in a very old population of Swedish people: A longitudinal study. **Experimental Gerontology**, v.29, n.5, p.531-541, 1994.

YANG, T.; WANG, H. N.; WANG, X.; TANG, J. N.; LU, D.; ZHANG, Y. F.; GUO, Z. C.; LI, Y. L.; GAO, R.; KANG, R. M. The protective immune response against infectious bronchitis virus induced by multi-epitope based peptide vaccines. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.73, n.7, p.1500-1504, 2009.

YE, X.; AVENDANO, S.; DEKKERS, J. C. M.; LAMONT, S. J. Association of twelve immune-related genes with performance of three broiler lines in two different hygiene environments. **Poultry Science**, v.85, n.9, p.1555-1569, 2006.

ZEKARIAS, B.; HUURNE, A. A. H. M. T.; LANDMAN, W. J. M.; REBEL, J. M. J.; POL, J. M. A.; GRUYS, E. Immunological basis of differences in disease resistance in the chicken. **Veterinary Research**, v.33, n.2, p.109-125, 2002.

ZHU, L. Q.; WU, S. L.; ZHANG, G. P.; ZHU, G. Q. The cellular receptors for infectious bursal disease virus **African Journal of Biotechnology**, v.7, n.25, p.4832-4835, 2008.

ZUCKERMANN, F. A. Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.72, n.1-2, p.55-66, 1999.

ANEXO 1 – ANÁLISE DE MICOTOXINAS NA RAÇÃO

LAMIC - Laboratório de Análises Micotoxicológicas - UFSM
CCR & CCS DMVP & DACT FATEC • Coordenação: Prof. C. A. Mallmann
Prédio 44, 3º andar, ala norte • Santa Maria (RS) 97.105-900
Fones (55) 3220 8445 • 3220 8073 • 9961 4377 • www.lamic.ufsm.br

::. Resultado de Análise .::

:: Identificação ::

Requisitante: LUIZ FELIPE CARON
Número do Laudo: 10847/09
Responsável: Luiz Felipe Caron
Endereço Eletrônico:
Endereço: Rod. do Xisto, Km 21, n. 7008
CEP: 83705-740
Cidade: ARAUCÁRIA
UF: PR
Fone: (41)3642 6606
Fax: .
Data/Hora - Entrada: 27/07/2009 - 10:00
Data/Hora - Saída: 28/07/2009 - 10:00
Tempo de Laboratório: 24:00h
Observações: NÃO COBRAR, ANÁLISE CORTESIA.

Amostra 10847/09 RC Focus 3440 Post crá, Amostra A.

Resultados da Micotoxinas

AF B1	AF B2	AF G1	AF G2	ZEA
ND	ND	ND	ND	221

Amostra 10848/09 RC Focus 3129 Postura I ,Amostra B.

Resultados da Micotoxinas

AF B1	AF B2	AF G1	AF G2	ZEA
ND	ND	ND	ND	178

Amostra 10849/09 RC Focus 3130 Postura II Amostra C.

Resultados da Micotoxinas

AF B1	AF B2	AF G1	AF G2	ZEA
ND	ND	ND	ND	153

Análises disponíveis: AFM1, AME, CPA, F B1, FB2, IME, 3DON, 15DON, DON, NIV, DAB, FX, PAT, HT-2 ,OTA, T-2, ERG, Aw

LAMIC - Laboratório credenciadopelo Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA) para executar análises de aflatoxinas emprodutos, subprodutos e derivados de origemvegetal (Port. 129 da30 de dezembro de 2007). O LAMIC também é aferido pelo controle dequalidade analítica do Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS), da Inglaterra.
Resultados expressos em µg/Kg= ppb; Ergosterol= Resultados expressos em mg/kg= ppm; Aw= Atividade de água; ND= < Limite de Quantificação; Aminoácidos= g/100g; GH= Coeficiente de similaridade da calibração com relação à amostra. Geralmente, se GH >3, as previsões não são precisas.Métodos Utilizados: Metodologia de extração, clarificação e derivação 100% automatizada, desenvolvida evalidada "inhouse" e análisepor Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa/Massapara TRCs (LCMS/MS). Aminoácidos analisados por HPLC/UV, pós digestão ácida ou NIRS.
Limites de Quantificação / Coeficiente de Recuperação: AFB1 (Aflatoxina B1) 1µg/kg/94,9%; AFB2 (Aflatoxina B2) 1µg/kg/80,0%; AFG1 (AflatoxinaG1) 1µg/kg/885%; AFG2 (Aflatoxina G2) 1µg/kg/88,1%; AFM1 (Aflatoxina M1) 0,006 µg/kg/86%;

ZEA (Zearalenona)10µg/kg/85,0% (LCMB/MB); 15DON (15-Acetil Deoxinivalenol) 100µg/kg/91%; 3DON (3-Acetil Deoxinivalenol) 100µg/kg/87%; DON (Deoxinivalenol) 140µg/kg/94%; DAB (Diacetoxidirpenol) 100µg/kg/96%; ERG (Ergosterol) 0,1 mg/kg/99,6%; Fumonisina B1e B2 (LCMB/MB FB1 e FB2), 50 µg/kg cada/94,0%; FX (Fusarenon X) 100µg/kg/75%; NIV (Nivalenol) 100µg/kg/74%; OTA (Ocratoxina A) 2µg/kg/80%; PAT (Patulina) 2µg/kg/87%; T-2 100µg/kg/96%; HT-2 100µg/Kg/98%Os resultados restringem-se tão somente à amostra analisada. Este certificado não poderá ser reproduzido parcialmente.

Estamos realizando nova análise - Ácido Ciclopiazônico (CPA) - Provável causa de lesões de moela!!!!

Santa Maria, 28 de julho de 2009 .

ANEXO 2 – LEUCOGRAMA

LAB&VET

Av. Escola Politécnica, 4445 www.labvet.com.br
CEP: 05.350-000 São Paulo - SP Tel: 11-37192297

Nome: ISOLADOR 7-2 Espécie: GALLUS GALLUS Exame: 196791
Raça: --- Sexo: - Idade: -
Proprietário(a): BIOVET
Médico(a) Veterinário(a): Dr.(a) JANE SILVEIRA FRAGA
Data: 05/02/2010 Entrega: F4158-8224C-BIOVE

LEUCOGRAMA

Leucócitos:	5700	/µl	
			VALORES DE REFERÊNCIA
			NÃO DISPONÍVEIS PARA ESTA
			ESPÉCIE ANIMAL
Heterófilos:	30	1710	
Linfócitos:	58	3306	
Monócitos:	5	285	
Eosinófilos:	2	114	
Basófilos:	5	285	

Observações: LINFÓCITOS REATIVOS +--
GRANULAÇÕES AZURÓFILAS (+)--
MACRÓFAGOS CIRCULANTES

Amostra: SANGUE TOTAL EM EDTA
PRESENÇA DE AGREGADOS LEUCOCITÁRIOS

Cynthia C.V. da Silva
Médica Veterinária
CRMV-SP 22262

ANEXO 3 – TABELA BRIDLE ET AL., 2006

Table II. Proportions of peripheral blood T lymphocyte subsets in the 3 age groups of the 2 hybrids, as compared with published values for laboratory-raised outbred WLH chickens (25)

	Mean percentage of positive cells ± standard deviation (and range)						
		Dekalb Delta hybrid			H&N hybrid		
Surface molecule	Outbred WLH chickens	Juvenile[a] (*n* = 19)	Young adult[b] (*n* = 20)	Adult[c] (*n* = 20)	Juvenile[a] (*n* = 20)	Young adult[b] (*n* = 20)	Adult[d] (*n* = 20)
CD3	78 ± 3	93.7 ± 3.8 (83.6–97.9)	85.6 ± 7.9 (69.9–96.4)	88.5 ± 5.3 78.4–96.1	93.7 ± 4.0 79.2–97.5	90.2 ± 6.0 73.7–98.2	81.2 ± 7.1 68.9–92.9
CD4	39 ± 6	53.3 ± 5.7 (41.3–60.7)	43.1 ± 6.5 (30.8–55.8)	62.0 ± 7.8 (46.2–74.2)	58.7 ± 6.1 (44.2–68.8)	51.8 ± 10.1 (34.7–72.9)	56.0 ± 9.7 (40.8–75.4)
CD8	12 ± 2	44.1 ± 7.6 (34.6–65.1)	35.9 ± 8.7 (22.4–53.2)	35.7 ± 9.2 (19.5–52.6)	42.4 ± 8.6 (31.4–58.4)	40.8 ± 9.1 (27.3–56.2)	31.3 ± 7.2 (20.5–47.2)
$CD8^{dim}$	—	24.7 ± 6.8 (16.3–44.0)	22.0 ± 7.1 (12.1–40.7)	22.8 ± 8.9 (6.6–33.4)	32.6 ± 9.6 (16.6–49.6)	30.7 ± 11.2 (16.6–52.1)	25.3 ± 7.8 (15.2–44.9)
$CD8^{bright}$	—	19.4 ± 2.6 (15.7–24.1)	13.9 ± 5.0 (6.7–23.8)	13.0 ± 4.8 (4.4–22.4)	9.9 ± 3.0 (4.9–14.8)	10.0 ± 4.8 (3.5–21.6)	6.0 ± 4.0 (0.9–14.3)
$CD8^{dim}$:$CD8^{bright}$ ratio	—	1.3 ± 0.4 (0.8–2.1)	1.8 ± 1.0 (0.8–4.3)	2.2 ± 1.6 (0.5–6.6)	3.8 ± 1.9 (1.1–8.7)	4.4 ± 3.7 (0.8–12.9)	7.7 ± 8.2 (1.1–36.4)
TCR1	23 ± 3	22.9 ± 5.3 (16.2–33.2)	28.9 ± 7.7 (17.3–45.3)	13.8 ± 3.6 (8.7–21.6)	28.1 ± 4.1 (21.7–38.4)	28.3 ± 3.8 (22.7–34.1)	19.7 ± 7.3 (6.9–36.9)
TCR2	45 ± 2	54.1 ± 6.2 (42.5–64.6)	43.9 ± 8.1 (26.7–59.4)	56.1 ± 5.6 (45.8–65.5)	57.1 ± 5.1 (45.7–64.6)	50.5 ± 7.1 (36.1–63.3)	51.0 ± 7.1 (39.7–64.6)
TCR3	13 ± 2	17.0 ± 4.5 (8.6–27.7)	12.6 ± 4.0 (4.0–19.0)	18.8 ± 4.9 (10.5–28.0)	10.9 ± 1.1 (8.3–12.4)	10.7 ± 1.7 (7.0–13.5)	11.3 ± 3.0 (7.9–19.2)
CD4:CD8 ratio	3.25 ± 0.05	1.2 ± 0.2 (0.9–1.8)	1.3 ± 0.3 (0.7–1.9)	1.8 ± 0.5 (1.2–3.0)	1.4 ± 0.3 (1.1–2.2)	1.3 ± 0.3 (1.0–2.1)	1.9 ± 0.6 (1.0–3.3)

[a] Aged 9 wk
[b] Aged 25 wk
[c] Aged 80 wk
[d] Aged 79 wk

RESULTADOS DA IMUNOFENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS PERIFÉRICOS REALIZADA POR BRIDLE E COLEGAS (2006) (EXTRAÍDO DESSE TRABALHO) E USADOS PARA A COMPARAÇÃO COM O PRESENTE ESTUDO.

ANEXO 4 – VALORES DE REFERÊNCIA DE LEUCOGRAMA

Table 1: Haemogram of Arian (A), Arbore-Acres (AA), Ross (R) and Cobb (C) broiler strains (Mean ± SEM)

Age (days)	Strain	RBC (x10⁶/µL)	PCV (%)	Hb (g/dl)	MCV (fl)	MCH (Pg)	MCHC (%)	ESR (mm/h)
1	A	2.19 ± 0.05	28.6 ± 1.8	7.5 ± 0.67	120.4 ± 0.6	34.9 ± 3.6	23.4 ± 1.51	3.0 ± 0.0
	AA	2.14 ± 0.06	28.28 ± 0.7	12.19 ± 0.2	132.3±3.3	57.11±1.56	43.22±1.09	3.05±0.3
	C	2.04 ± 0.1	27.43 ± 0.97	11.84 ± 0.23	132.28 ± 4.0	58.14 ± 2.79	43.4 ± 0.94	3.0 ± 0.1
	R	1.97 ± 0.08	28.28 ± 0.7	11.98 ± 0.27	144.26 ± 3.88	61.58 ± 1.46	42.37 ± 0.68	3.0 ± 0.01
7	A	2.21 ± 0.09	29.5 ± 0.57	8.2 ± 0.8	118.0 ± 2.64	35.9 ± 1.3	25.7 ± 3.72	3.0 ± 0.0
	AA	2.29 ± 0.1	28.57 ± 0.8	12.78 ± 0.17	125.6±4.35	56.32±2.06	44.85±1.03	3.11±0.6
	C	2.08 ± 0.1	27.58 ± 0.96	11.86 ± 0.31	132.02 ± 4.76	56.57 ± 1.58	42.61 ± 1.12	3.05 ± 0.03
	R	2.12 ± 0.15	29 ± 0.84	12.25 ± 0.23	140.37 ± 8.71	60 ± 4.25	42.3 ± 0.52	3.02 ± 0.02
14	A	2.73 ± 0.43	31.3 ± 0.7	9.5 ± 0.89	125.5 ± 0.5	36.6 ± 0.57	27.1 ± 2.47	3.0 ± 0.0
	AA	2.35 ± 0.12	29.4 ± 0.15	13.06 ± 0.32	125.7±3.06	55.85±1.54	44.6±1.34	3.03±0.04
	C	2.14 ± 0.14	28.14 ± 1.07	12 ± 0.33	130.62 ± 3.41	56.14 ± 1.05	42.65 ± 0.66	3.08 ± 0.05
	R	2.26 ± 0.12	29 ± 0.84	12.95 ± 0.18	129.81 ± 3.21	58.42 ± 2.02	44.77 ± 0.73	3.02 ± 0.03
21	A	2.74 ± 0.41	32.3 ± 1.5	10.2 ± 0.51	113.4 ± 2.31	36.6 ± 2.1	28.5 ± 1.20	3.0 ± 0.0
	AA	2.39 ± 0.09	30.7 ± 0.86	13.19 ± 0.25	129.0±5.48	55.37±2.04	43.01±0.98	3.27±0.09
	C	2.34 ± 0.49	29.0 ± 0.92	12.23 ± 0.3	126.58 ± 6.1	54.51 ± 3.32	41.57 ± 0.78	3.1 ± 0.07
	R	2.33 ± 0.09	29.57 ± 0.1	13.09 ± 0.12	129.41 ± 4.38	57 ± 1.75	44.67 ± 0.8	3.08 ± 0.05
28	A	2.79 ± 0.48	32.8 ± 2.9	12.6 ± 0.79	113.8 ± 0.52	46.8 ± 2.9	34.6 ± 2.63	3.0 ± 0.0
	AA	2.5 ± 0.15	31.0 ± 0.37	13.42 ± 0.64	123.8±6.98	52.88±3.54	43.21±1.93	3.11±0.06
	C	2.38 ± 0.12	29.85 ± 0.5	12.77 ± 0.3	124.81 ± 5.75	53.41 ± 0.31	42.87 ± 1.37	3.1 ± 0.05
	R	2.42 ± 0.12	30.14 ± 0.46	13.38 ± 0.3	128.26 ± 6.98	56.14 ± 2.15	43.93 ± 0.44	3.08 ± 0.06
35	A	2.86 ± 0.34	33.1 ± 2.9	13.3 ± 0.84	115.8 ± 0.14	47.6 ± 5.2	42.4 ± 2.18	3.0 ± 0.0
	AA	2.8 ± 0.19	32.14 ± 0.1	13.52 ± 0.1	116.6±4.31	48.94±2.87	42.25±1.13	3.17±0.06
	C	2.17 ± 0.15	31.28 ± 1.01	13.48 ± 0.21	120.22 ± 4.69	53.0 ± 2.09	43.17 ± 0.84	3.15 ± 0.04
	R	2.83 ± 0.09	31.0 ± 0.82	13.46 ± 0.26	125.44 ± 4.28	53.34 ± 0.6	42.61 ± 0.54	3.13 ± 0.05
42	A	2.88 ± 0.23	34.0 ± 1.0	13.7 ± 0.7	118.4 ± 0.57	48.5 ± 1.2	45.4 1.27	3.0 ± 0.0
	AA	2.85 ± 0.12	32.71 ± 0.94	13.95 ± 0.22	114.9±1.5	49.84±1.09	42.75±0.68	3.21±0.04
	C	2.82 ± 0.14	32.0 ± 0.81	14.11 ± 0.2	119.01 ± 1.0	50.62 ± 1.46	43.45 ± 0.78	3.18 ± 0.05
	R	2.84 ± 0.18	31.71 ± 1.32	13.94 ± 0.25	120.11 ± 0.4	51.04 ± 1.59	43.07 ± 1.13	3.17 ± 0.05
49	A	2.9 ± 0.24	35.2 ± 0.4	15.4 ± 0.84	121.7 ± 0.74	52.7 ± 4.2	46.2 ± 0.68	3.0 ± 0.0
	AA	2.91 ± 0.1	33.0 ± 0.53	14.5 ± 0.23	114.1±2.53	50.8 ± 0.76	43.97 ± 0.34	3.34±0.03
	C	2.9 ± 0.14	32.28 ± 1.04	14.25 ± 0.4	113.95 ± 2.79	50.45 ± 1.89	44.27 ± 0.72	3.18 ± 0.04
	R	2.97 ± 0.07	32.43 ± 1.06	14.1 ± 0.38	115.65 ± 2.3	50.74 ± 2.4	43.48 ± 0.4	3.18 ± 0.07
56	A	2.94 ± 0.41	37.7 ± 1.33	16.1 ± 0.6	127.2 ±1.09	54.0 ± 6.6	47.2 ± 2.6	3.0 ± 0.0
	AA	3.1 ± 0.05	35.71± 0.77	15.97 ± 0.24	113.84±1.33	51.5 ± 0.43	44.77±0.35	3.21±0.08
	C	3.0 ± 0.04	35.71 ± 0.68	16.03 ± 0.23	111.88 ± 1.99	49.37 ± 1.73	45.08 ± 0.43	3.27 ± 0.06
	R	3.06 ± 0.15	35.43 ± 0.84	15.85 ± 0.25	113.74 ± 3.38	48.34 ± 1.26	45.05 ± 0.64	3.27 ± 0.05
Average	A	2.69 ± 0.09	32.72 ± 0.93	11.83 ± 1.0 3	117.91±1.57	43.73 ± 2.56	35.61±3.24	3.0 ± 0.0
	AA	2.59 ± 0.05	31.28 ± 0.16	13.62 ± 0.16	121.75±1.49	53.18 ± 0.72	43.62±0.36	3.18±0.02
	C	2.49 ± 0.05	30.39 ± 0.42	13.17 ± 0.19	123.49 ± 1.58	53.58 ± 0.71	43.23 ± 0.3	3.12 ± 0.1
	R	2.53 ± 0.06	30.73 ± 0.39	13.44 ± 0.16	127.45 ± 1.92	55.18 ± 0.87	43.58 ± 0.25	3.1 ± 0.02

VALORES DE REFERÊNCIA PARA VÁRIAS IDADES E RAÇAS DE GALINHAS (TALEBI *et al.*, 2005)

TABLE 178.6 Hematologic Values for the Chicken (*Gallus gallus domesticus*)[3]

Parameter	Interval
Erythrocytes/µL	2,500,000–3,500,000
Hemoglobin (g/dL)	7–13
PCV %	22–35
MCV (fL)	90–140
MCH (pg)	33–47
MCHC (%)	26–35
Reticulocytes (%)	0–0.6
Leukocytes/µL	12,000–30,000
Heterophil (band)	Rare
Heterophil	3000–6000
Lymphocyte	7000–17,500
Monocyte	150–2000
Eosinophil	0–1000
Basophil	Rare

TABLE 178.7 Reference Intervals for Leukocytes From Healthy 22- to 24-Week-Old Male Broiler-Type Chickens (N = 89)

Cell Type	Reference Interval
Leukocytes/µL	7940–24,280
Heterophils	1703–9746
Lymphocytes	2639–10,294
Monocytes	544–4123
Eosinophils	0–346
Basophils	382–2499

VALORES DE REFERÊNCIA PARA GALLUS GALLUS DOMESTICUS E PARA GALOS DE IDADES ESPECÍFICAS ((FELDMAN *et al.*, 2006)

ANEXO 5 – VALORES OBTIDOS EM INFECÇÃO POR IBV

	Controle	Dia 5 pi	Dia 10 pi	Dia 17 pi	Dia 30 pi	Dia 45 pi
CD4	36,05 ± 28,82	18,54 ± 11,76	36,24 ± 6,65	48,66 ± 9,57	41,10 ± 5,15	49,93 ± 1,85
CD8α	41,25 ± 9,74	23,91 ± 17,40	32,86 ± 8,45	57,01 ± 8,49	38,45 ± 2,32	48,49 ± 4,85
CD4:CD8α	0,80 ± 0,61	0,92 ± 0,64	1,13 ± 0,17	0,85 ± 0,11	1,08 ± 0,19	1,03 ± 0,07
CD8β	28,28 ± 36,07^{b}	2,10 ± 1,70^{c}	1,16 ± 1,13^{c}	69,55 ± 12,79^{a}	0,76 ± 1,17^{c}	17,13 ± 4,84^{bc}
TCRVβ1	43,58 ± 16,30^{a}	24,48 ± 8,47^{b}	31,39 ± 6,26^{b}	49,09 ± 13,45^{a}	43,50 ± 5,81^{ab}	48,48 ± 8,80^{a}
TCRVβ2	47,74 ± 44,15^{b}	1,38 ± 0,56^{c}	31,94 ± 17,39^{b}	79,53 ± 13,08^{a}	88,92 ± 0,23^{a}	91,96 ± 2,46^{a}
MHC I	22,29 ± 25,72^{b}	0,68 ± 0,48^{c}	0,13 ± 0,09^{c}	34,71 ± 9,33^{a}	0,27 ± 0,12^{c}	33,82 ± 11,70^{a}
MHC II	50,18 ± 33,33^{b}	14,98 ± 6,16^{c}	24,49 ± 6,30^{c}	69,60 ± 12,11^{a}	17,66 ± 4,76^{c}	58,09 ± 15,19^{ab}
MHC II^{bright}	6,92 ± 3,69^{a}	8,86 ± 4,97^{a}	7,67 ± 2,46^{a}	5,01 ± 1,72^{a}	2,68 ± 0,78^{ab}	2,44 ± 0,86^{c}
CD28	49,15 ± 23,92^{b}	34,36 ± 14,52^{c}	7,53 ± 4,76^{c}	69,83 ± 8,36^{a}	53,86 ± 3,80^{ab}	50,25 ± 6,96^{b}
CD8^{+}CD28^{-}	0,247 ± 0,07^{c}	-	-	0,58 ± 0,14^{c}	5,90 ± 0,62^{b}	11,79 ± 2,63^{a}
CD8^{+}CD28^{+}	41,02 ± 2,44^{ab}	-	-	48,23 ± 7,79^{a}	41,81 ± 1,91^{ab}	36,55 ± 4,71^{b}
CD8^{-}CD28^{+}	55,79 ± 3,98^{a}	-	-	46,23 ± 7,06^{b}	17,82 ± 3,57^{c}	13,95 ± 2,94^{c}

RESULTADOS DA AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA POR CITOMETRIA DE FLUXO DE GALOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA AVIÁRIA (IBV). FORAM FEITAS 5 AFERIÇÕES PÓS A INFECÇÃO (PI). O GRUPO CONTROLE CONSTITUIU-SE DE AVES NÃO INFECTADAS, AVALIADAS NO MESMO DIA DAS AVES MANTIDAS SOB DESAFIO. OS RESULTADOS SÃO MOSTRADOS COMO MÉDIA ± SD. $^{A,\ AB,\ B,\ C}$ INDICAM DIFERENÇAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (TESTE DE FISHER, P<0,05) ENTRE OS GRUPOS.