



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
TESE DE DOUTORADO**

**EXPRESSÃO GÊNICA NO BAÇO ASSOCIADA AO MECANISMO DE RESISTÊNCIA A
COCCIDIOSE EM *Gallus gallus***

Erik Amazonas de Almeida

**RECIFE
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
TESE DE DOUTORADO**

**EXPRESSÃO GÊNICA NO BAÇO ASSOCIADA AO MECANISMO DE RESISTÊNCIA A
COCCIDIOSE EM *Gallus gallus***

Erik Amazonas de Almeida

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação *Strito sensu* em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientadora: Laura Helena Vega Gonzales Gil

Co-orientador: Giovani Rota Bertani

**RECIFE
2012**

Almeida, Erik Amazonas de

Expressão gênica no baço associada ao mecanismo de resistência a coccidiose em *Gallus gallus*. – Recife: O Autor, 2012.

155 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Laura Helena Vega Gonzales Gil

Coorientador: Giovani Rota Bertani

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas. Genética, 2012.**

Inclui bibliografia e anexos

1. Coccidiose 2. *Gallus gallus* 3. Genética animal I. Título.

571.9648

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-055

ERIK AMAZONAS DE ALMEIDA

**Expressão Gênica no baço associada ao mecanismo de resistência a coccidiose em
*Gallus gallus***

APROVADO EM ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Titulares:

Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior, Departamento de Genética,
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Clara Nilce Barbosa, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade
Federal Rural de Pernambuco

Dra. Sheilla Andrade de Oliveira, Departamento de Imunologia, Fiocruz - CPqAm

Dra. Laura Helena Vega Gonzales Gil, Departamento de Virologia, Fiocruz - CPqAM

Prof. Dr. Giovani Rota Bertani, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de
Pernambuco

Suplentes:

Prof. Dr. Tercílio Calsa Júnior, Departamento de Genética, Universidade Federal de
Pernambuco

Dr. Bartolomeu Acioli dos Santos, Departamento de Virologia, Fiocruz - CPqAM

**Recife, PE
2012**

Aos meu pais,
Gildo e Angela,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Laura Gil e Giovani Bertani, pelo constante ensinamento em incontáveis discussões científicas, acadêmicas, profissionais, sociais, pessoais e filosóficas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela bolsa concedida, e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, pelo financiamento do projeto.

Aos professores e pesquisadores da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE dos Departamentos de Genética e Bioquímica, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CpqAM e do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA, por tudo que aprendi nestes anos do doutorado e pelas portas abertas. Um agradecimento especial a Benilton Carvalho, Ulisses Braga Neto, Ivan Gesteira, Valdir Balbino, Marcos Moraes, José Luiz de Lima Filho, Cíntia Renata Costa Rocha, Maria da Paz Carvalho da Silva, Maria Elizabeth Cavalcante Chaves, Danyelly Brunessa Gondim Martins.

Aos colegas do departamento de Genética.

Aos amigos-colegas *Lavíticos* e do laboratório de Biologia Molecular do LIKA.

A José Valter e Klécia pela ajuda com a clonagem e sequenciamento da NK-lisina.

Aos amigos Álvaro Bicudo, Edenilza Bicudo e ao gracioso Nicolas “Bicudinho” por me acolherem durante a minha estada profissional em Garanhuns, facilitando em muito a minha vida!

A Dimas Gabriel, pelas primeiras identidade dos genes diferencialmente expressos.

A Matheus de Mello Freire, que me ensinou a mágica do `< grep -f >` e do `< :%s/(ctrl+v)(ctrl+m)^r/g ENTER >` para a identificação dos genes diferencialmente expressos!

Ao Steve Jobs, Steve Wozniak, Bill Gates, Linus Torvalds e Robert Gentleman, por suas contribuições para trazer a computação para a palma de nossas mãos.

Às pessoas que, com seu trabalho e dedicação, motivam todo o esforço no sentido de melhorar o mundo: George Roger Waters, David Jon Gilmour, Nicholas Berkeley Mason, Richard Nathaniel Wright, Roger Keith Barrett, Stephen Percy Harris, Paul Bruce Dickinson, Michael Henry McBrain, Janick Robert Gers, David Michael Murray, Adrian Frederik Smith, Stephen James William John Howe, John Winston Lennon, James Paul McCartney, Richard Starkey Jr., George Harrison, Sir James Patrick Page, Sir Robert Anthony Plant, Sir John "Paul Jones" Baldwin, Sir John Henry Bonham, Farrokh Bulsara, Neil Percival Young e Ian Scott Anderson.

Aos indígenas Guarani, pelo hábito de consumo da infusão de *Ilex paraguariensis*.

À Loiva, Karine, Marcos e Matheus, cada um do seu jeito, na sua intensidade.

A Sandra... sem palavras. Está tudo evidente no meu semblante! Por toda a motivação! Pelas conversas imunológicas, quantitativas, expressivas. E, claro, pelo *housekeeping gene* “Home, home again! I like to be here when I can!”

À minha irmã, Adriana, pelo amor e apoio incondicional que sempre me dedicou.

Aos meus pais, pela influência genética e ambiental. Vocês sempre foram, desde os primórdios, e sempre serão os meus dois maiores exemplos nos campos pessoal – acima de tudo –, profissional e científico.

Finalmente, peço permissão para agradecer mais uma vez a Giovani e Laura, agora não como orientadores, mas como amigos! Pessoas por quem tenho profunda admiração pela simplicidade e leveza que lhes são tão peculiares.

“Quiet people have the loudest minds”.
(Stephen Hawking)

RESUMO

A avicultura brasileira gera grandes divisas para o país e fornece alimento a baixo custo para a população. Entretanto, os problemas sanitários que acometem a indústria avícola afetam todo o sistema produtivo, podendo acarretar perdas no mercado mundial ou elevação dos preços do produto final. Dentre as enfermidades mais frequentes na avicultura mundial e brasileira está a coccidiose, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Eimeria spp.*, sendo *E. maxima*, *E. acervulina* e *E. tenella* os agentes causadores mais comuns. Este estudo avaliou a expressão gênica em resposta à infecção por *E. tenella* no baço de três linhagens de galinhas: uma selecionada para altas taxas de crescimento e desenvolvimento muscular (TT), outra selecionada para altas taxas de fertilidade e postura de ovos (CC), e uma terceira linhagem não selecionada geneticamente (CCc), um controle genético de CC. As duas linhagens selecionadas (TT e CC) apresentaram, em estudo anterior, diferenças na resistência/susceptibilidade à coccidiose. As aves foram inoculadas com *E. tenella* e seus tecidos foram colhidos aos dias 0 (pré-infecção), 2, 6 e 9 pós-infecção. O perfil de expressão gênica no baço das aves foi avaliado por meio de microarranjos de DNA contendo 13.000 pontos de genes impressos, oriundos de tecido linfóide de aves. RT-PCR quantitativo em tempo real foi realizado para avaliar o perfil de expressão de *NK-lisina* – uma citocina produzida por linfócitos T e células *natural killer*, e responsável pelo recrutamento e ativação de outras citocinas e células de defesa. O estudo de microarranjos revelou importantes conjuntos de genes diferencialmente expressos entre as linhagens. Aves da linhagem mais resistente CC apresentaram um padrão de expressão de genes que codificam imunoglobulinas e citocinas maior do que os animais TT. Dentre esses genes, encontram-se *galinacina*, uma β -defensina de aves, e IRF-10. Ambas atuam no combate a patógenos intracelulares. Já a linhagem TT apresentou maior expressão de *IL1-F5*, uma citocina antagônica de IL-1, que atua inibindo *NF- κ B*, um fator importante na diferenciação de linfócitos e estímulo de *IRF10* e *IFN- γ* . Entre as linhagens que compartilham uma maior proximidade genética, CC e CCc, as diferenças foram quantitativa e qualitativamente mais sutis. Consistente com esse padrão, os níveis de expressão de *NK-lisina* foram maiores na linhagem CC durante o período pré-infecção. Já no segundo dia após a infecção, TT mostrou uma expressão muito superior a CC e CCc, possivelmente devido à sua inabilidade em prontamente combater a doença. Ao avançar da infecção, a expressão gênica foi homogênea entre as linhagens. É possível que a seleção genética para características de postura possa ter favorecido a expressão basal de genes envolvidos com defesa celular, promovendo maior condição de resistência a doenças aos animais.

Palavras-chave: coccidiose, expressão gênica, galinha, microarranjo, RT-qPCR, resistência a doenças.

ABSTRACT

Poultry production is one of the wealthiest and most prosper activity of the Brazilian economy. It is also responsible for supplying affordable meal for its population. Animal health issues can, however, affect the entire productive system, risking the country's global market share and raising the costs of chicken's meat. Coccidiosis is one of the most common disease in the worldwide rearing systems and it also affects Brazilian producers. It is caused by several species of *Eimeria* protozoan, in which *Eimeira maxima*, *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* are reported to be the most common. Here we studied the gene expression profile in the spleen after *E. Tenella* infection in three different chicken lines: a broiler (TT), a layer (CC) and an unselected line (CCc), which was not artificially selected. The two selected lines with divergent phenotypes (TT and CC) were previously reported as having different resistance to coccidiosis. The birds were orally infected with *E. tenella* oocysts and their spleen were collected at day 0 (prior to infection), 2, 6 and 9 post-infection. Splenic gene expression profile was evaluated by DNA microarray containing 13,000 spots of genes from lymphoid tissues of chicken. Real time quantitative RT-PCR was performed to investigate the gene expression profile for *NK-lysin*, a cytokine produced by T cells and natural killer cells and responsible for the commitment and recruitment of other cytokines and defense cells. Microarray analysis revealed that important sets of genes related to the immune system were differentially expressed between the selected lines. CC birds showed greater gene expression pattern of genes coding for immunoglobulins and cytokines than TT animals did. *Gallinacin*, an avian β -defensin, and *IRF-10* are among these differentially expressed genes. Both are important mediators and effectors of the cellular immune response. The TT line showed upregulation of IL1-F5, an antagonist of IL-1 cytokine, resulting in inhibition of *NF- κ B*, which is an importante regulator and stimulator of T lymphocyte differentiation and induction of *IRF-10* and *IFN- γ* . Consistent to this pattern, *NK-lysin* mRNA expression was higher among the CC line at the pre-infection period. At 2 days post-infection, TT birds showed much greater *NK-lysin* levels than CC e CCc. At later days of infection *NK-lysin* levels dropped to more homogeneous levels between the studied lines. It is possible that selection for laying could have favored the basal expression of genes related to the host's cellular defense providing increased resistance.

Keywords: chicken, coccidiosis, disease resistance, gene expression, microarray, RT-qPCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Local de infecção (em vermelho forte) por espécie de <i>Eimeria</i> spp. no intestino de galinha	27
Figura 2. Ciclo de vida e infecção de <i>Eimeria</i> spp.	28
Figura 3. Genes da região B-F/B-L do MHC de galinha.	55
Figura 4. Esporozíto de <i>Eimeria tenella</i>	56
Figura 5. Esquema de infecção e colheita de tecido para a caracterização da expressão gênica.....	65
Figura 6. Peso (mg $\pm$ erro padrão) de ceco, tonsila cecal e baço relativo ao peso corporal das aves aos de postura (CC), respectivo controle (CCc) e corte (TT) 2, 6 e 9 dias pós-infecção.	85
Figura 7. Perfil de contagem de oocistos no ceco das aves de postura (CC), respectivo controle (CCc) e corte (TT) ao longo do período de infecção.....	86
Figura 8. Expressão relativa de NK-lisina entre as linhagens.....	87
Figura 9. Polimorfismos encontrados entre a sequência de RNAm de NK-lisina das linhagens CC, CCc e TT	88
Figura 10. Alinhamento das sequências de cDNA das linhagens CC, CCc e TT	89
Figura 11. Predição da sequência de aminoácidos de NK-lisina a partir das sequências de cDNA das linhagens CC, CCc e TT.....	90
Figura 12. Genes diferencialmente expressos entre CC e CCc pré-infecção	91
Figura 13. Genes diferencialmente expressos entre CC e CCc 2 dias pós-infecção	92
Figura 14. Genes diferencialmente expressos entre TT e CC pré-infecção.....	97
Figura 15. Genes diferencialmente expressos entre TT e CC 2 dias pós-infecção.....	98
Figura 16. Uma hipótese de como a expressão diferencial de <i>IRF-10</i> , <i>galinacina</i> e <i>IL-1F5</i> entre as linhagens de postura CC e de corte TT pode contribuir para o fenótipo de resistência/susceptibilidade	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esquema de hibridização nos microarranjos, agrupado por pool e estratégia de marcação para os dye-swaps.	74
Tabela 2. Sequência dos iniciadores de NK-lisina e GAPDH utilizados em qRT-PCR	81
Tabela 3. Peso (mg, LSMEAN) $\pm$ erro padrão (EP) de ceco, tonsila cecal e baço das linhagens de aves de postura (CC), respectivo controle (CCc) e corte (TT) pré- e pós-infecção por <i>E. tenella</i>	84
Tabela 4. Peso (mg, LSMEAN) $\pm$ erro padrão (EP) de ceco, tonsila cecal e baço em relação ao peso vivo das linhagens de aves de postura (CC), respectivo controle (CCc) e corte (TT) pós-infecção <i>E. tenella</i>	84
Tabela 5. Número médio de oocistos (LSMEAN) $\pm$ desvio-padrão contados no ceco das aves de postura (CC), respectivo controle (CCc) e corte (TT), em milhões de oocistos	86
Tabela 6. Genes diferencialmente expressos entre as linhagens de postura CC e CCc pré-infecção	93
Tabela 7. Genes diferencialmente expressos entre as linhagens de postura CC e CCc pós-infecção (dpi2)	95
Tabela 8. Genes diferencialmente expressos entre as linhagens de corte TT e postura CC pré-infecção	99
Tabela 9. Genes diferencialmente expressos entre as linhagens de corte TT e postura CC de pós-infecção (dpi2)	101

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A ₂₆₀	Absorbância a 260 nm
A ₂₈₀	Absorbância a 280 nm
ABEF	Associação Brasileira de Exportadores de Frango
APC	Células apresentadoras de antígenos (do inglês, <i>antigen presenting cells</i>)
aRNA	RNA amplificado, modificado com aminoallyl
C1	Proteína 1 do complemento
C3	Proteína 3 do complemento
C5	Proteína 5 do complemento
CARD	Domínio de ativação e recrutamento de caspase, do inglês <i>caspase activation and recruitment domain</i>
CC	Linhagem de postura de <i>Gallus gallus</i>
CCc	Linhagem controle genético de CC
CD	Grupo de diferenciação (do inglês, <i>Cluster Designation</i>)
cDNA	DNA complementar
CRP	Proteína C reativa, do inglês <i>C-reactive protein</i>
CT	Ciclo de limiar para análise de PCR quantitativo
Cy3 e Cy5	Cianinas 3 e 5
CyDYE	Corante de cianina
d0	Dia pré-infecção
dATP	Desoxiadenosina Trifosfatada
DC	Célula dendrítica, do inglês <i>dendritic cell</i>
dCTP	Desoxicitidina Trifosfatada
DEPC	Dietil-pirocarbonato
dGTP	Desoxiguanosina Trifosfatada
DH10B	Linhagem de <i>Escherichia coli</i>
DH5α	Linhagem de <i>Escherichia coli</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Didesoxirribonucleotídeo
dpi	Dias pós-infecção
DTT	Ditrioteitol
dTTP	Desoxitimidina Trifosfatada
<i>Dye-Swap</i>	Troca de corantes entre os tratamentos do microarranjo
EB	Tampão de eluição para purificação plasmidial

FC	Alteração de expressão de um gene em relação a outro, em vezes
FD	Fator de diluição
GAI-1	Galinacina 1
GALT	Tecidos linfóides associados ao intestino
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GenBank	Banco de dados genômicos do Centro Nacional de Informação Biotecnologia (EUA)
HD	Suínos originados do cruzamento de Hampshire e Duroc
HNP-1	Neutrófilo defensina 1
IEL	Linfócitos intra-epiteliais (do inglês, intraepithelial lymphocytes)
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IgV	Cadeia leve variável da Imunoglobulina
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil tiogalactosídeo
IRAK	Quinase associada ao receptor de interleucina 1, do inglês <i>IL-1 receptor associated kinase</i>
IRF	Fator de regulação de interferon
IRS	Substrato de resposta a insulina; do inglês, <i>insulin response substrate</i>
IVT	Transcrição <i>in vitro</i>
kD	kilo-Daltons
LacZ	Operon de <i>E. coli</i> que codifica enzima para degradar galactose
Limma	Modelo linear para análise microarranjo (Linear Models for Microarray Analysis)
LogFC	Logaritmo na base 2 da diferença de expressão entre os tratamentos comparados
Lowess	Locally weighted scatterplot smoothing
LSMEAN	Média de quadrados mínimos (least-square mean)
M15.2	Linhagem de <i>Gallus gallus</i> da raça Fayoumi
M5.1	Linhagem de <i>Gallus gallus</i> da raça Fayoumi
MAC	Complexo de ataque à membrana; do inglês <i>membrane attack complex</i>
MALT	Tecidos linfóides associados à mucosa
MBL	Lectina ligante a manose
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal (do inglês, Major histocompatibility)
Milli-Q	Água ultrapura

MOPS	Ácido 3-(N-morpholino)propanossulfônico
NEI	Linhagem índice de suínos, selecionada para alto desempenho reprodutivo
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NK	Células assassinas naturais (do inglês, natural killer cells)
NOR	Região organizadora de nucléolo; do inglês, <i>nucleolar organizing region</i>
Oligo(dT)	Oligonucleotídeo composto exclusivamente de timinas (dTTP)
PALS	Película linfática peri-arteriolar, do inglês <i>peri-arteriolar lymphatic sheath</i>
PAMPs	Padrão molecular associado a patógenos, do inglês pathogen associated molecular patterns
PB	Tampão de ligação para purificação plasmidial
PBS	Tampão fosfato padrão
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PE	Tampão de lavagem para purificação plasmidial
pH	Potencial Hidrogênico
PRR	Receptor de Padrões de Reconhecimento, do inglês <i>Pattern Recognition Receptor</i>
PRRSV	Vírus da síndrome respiratória e reprodutiva em suínos
PWP	Polpa branca peri-elipsóide, do inglês <i>peri-ellipsoids white pulp</i>
QTL	Loci para características quantitativas
RFP-Y	Região do genoma da galinha contendo genes de MHC classe I e II
Rfp-Y	complexo fragmento de restrição padrão Y, do inglês <i>restriction fragment pattern Y</i>
RIG	gene induzido por ácido retinóico, do inglês <i>retinoic acid inducible gene-I</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RNAse	Enzima capaz de degradar RNA
ROS	Espécies reativas de oxigênio, do inglês <i>reactive oxygen species</i>
RT-qPCR	PCR quantitativo por transcrição reversa
SAP	Amilóide sérico P, do inglês <i>serum amyloid P</i>
SC	Linhagem de <i>Gallus gallus</i> resistentes à coccidiose
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SOC	Meio de cultura para bactérias composto por triptona e extrato de levedura
SSC	Citrato de sódio padrão
SYBR	Fluoróforo intercalaste de ácidos nucleicos

T7	Bacteriófago T7
Tc/s	Linfócitos T citotóxicos/supressores
TCR	Receptor de células T (do inglês, T Cell Receptor)
TGF- β	Fator transformante de crescimento tipo beta do inglês, <i>Transforming Growth Factor</i>
Th1	Linfócitos T auxiliares tipo 1 (do inglês, T helper)
Th2	Linfócitos T auxiliares tipo 1 (do inglês, T helper)
TIFF	Tagged Image File Format
TIR	Receptor de Interleucina 1 semelhante a Toll; do inglês <i>Toll-like/IL-1 receptor</i>
TK	Linhagens de <i>Gallus gallus</i> sensíveis à coccidiose
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês, Tumor Necrosis Factor)
TNLF	Fator semelhante a fator de necrose tumoral (do inglês, Tumor Necrosis-Like Factor)
TRAF	Fator associado ao receptor de TNF, do inglês <i>TNF receptor associated factor</i>
TRizol	Solução química para extração de ácidos nucleicos
TT	Linhagem de corte de <i>Gallus gallus</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
UTP	Uridina trifosfato
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo X-galactose

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xii
1. Introdução	18
2. Revisão de Literatura	19
2.1 Avicultura	19
2.2 Linhagens genéticas e resistência a doenças	22
2.2.1 População experimental da Embrapa	23
2.3 Coccidiose Aviária	25
2.3.1 Etiologia e aspectos clínicos	25
2.3.2 Ciclo de vida de <i>Eimeria</i> spp.	27
2.4 Imunologia das aves	29
2.4.1 Tecidos do sistema imune	29
2.4.2 Resposta imune inata	32
2.4.2.1 Receptores do sistema imune inato	33
2.4.2.2 Células do sistema imune inato	38
2.4.2.3 Fagócitos: neutrófilos e macrófagos	38
2.4.2.4 Células dendríticas	40
2.4.2.5 Linfócitos T $\gamma\delta$ TCR ⁺ e B-1	41
2.4.2.6 Células <i>Natural Killer</i>	41
2.4.3 Citocinas e quimiocinas	44
2.4.4 Resposta imune adaptativa	50
2.4.4.1 Resposta Celular	52
2.4.5 Imunidade à coccidiose	55
2.4.5.1 Relação hospedeiro-parasita	55
2.4.5.2 Imunidade inata e adaptativa à coccidiose	57
3. Objetivos	63
3.1 Objetivo Geral	63
3.2 Objetivos Específicos	63
4. Materiais e Métodos	64
4.1 Linhagens genéticas	64
4.2 Desafio das aves e colheita de tecidos	64
4.3 Contagem de oocistos	65
4.4 Extração de RNA total	65
4.5 Análise de pureza, concentração e integridade do RNA	66
4.6 Síntese de cDNA	68
4.7 Sequenciamento do gene NK-lisina	69
4.8 Análise da expressão gênica	72
4.8.1 Microarranjos	72
4.8.2 PCR quantitativo em tempo real	81
5. Resultados	83
5.1 Caracterização de tecidos linfóides	83
5.2 Contagem de oocistos no ceco	86
5.3 Análise da expressão de NK-lisina	87
5.4 Sequenciamento do cDNA de NK-lisina	88

5.5	Expressão gênica diferencial por meio de microarranjos entre CC x CCc	90
5.6	Expressão diferencial por meio de microarranjos entre CC x TT	97
6.	Discussão	102
6.1	Caracterização de tecidos linfóides e contagem de oocistos	103
6.2	NK-lisina	105
6.3	Expressão gênica global - Análise de Microarranjos	108
7.	Conclusões	112
8.	Referências	113
9.	Anexos	126
10.	Memorial	154

1. Introdução

A economia brasileira possui um elevado caráter agropecuário. A produção de frangos é responsável por fornecer proteína animal de elevado valor biológico a um preço acessível a grande parte da população, além de gerar riqueza para a nação através de sua exportação – 45% do frango exportado mundialmente são brasileiros.

Entretanto, o acometimento de aves com doenças produtivas compromete toda a cadeia e pode colocar em risco a posição de líder de mercado mundial e a produção de alimentos com custo reduzido.

A coccidiose é a enfermidade que mais acomete a avicultura industrial mundial, com incidência acima de 90% na indústria avícola brasileira. O controle da doença é feito com vacinas ou, mais frequentemente, quimioterápicos preventivos. No entanto, a eficiência desses métodos de controle é limitada devido ao desenvolvimento de resistência aos quimioterápicos, pela grande variabilidade de cepas de *Eimeria* existentes, e pelos custos de desenvolvimento de novos fármacos. Além disso, quimioterápicos podem resultar em possíveis resíduos na carne, o que vem sendo cada vez mais indesejável por mercados consumidores exigentes e pode vir a ser uma barreira comercial para o produto de exportação.

Para explorar um método alternativo para o controle da coccidiose, esta tese teve como objetivo identificar genes importantes na resposta à infecção por *Eimeria tenella* entre três linhagens genéticas de aves (TT, CC e CCc), que previamente apresentaram diferenças na susceptibilidade à doença. Foram identificados genes diferencialmente expressos entre as linhagens, o que contribui para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência à coccidiose.

2. Revisão de Literatura

2.1 Avicultura

O Brasil ocupa a condição de terceiro maior produtor mundial de carne de frango, atrás de Estados Unidos e China, e é o maior exportador desse produto, (Associação Brasileira de Exportadores de Frango, 2011). Essa condição tem sido mantida desde 2004 com participação de 38% no mercado mundial de exportação de carne de frango (<http://www.brazilianchicken.com.br/industria-avicola/o-frango-pelo-mundo.php> acesso em 23/09/2011). Tal condição privilegiada no cenário global se deu graças aos avanços tecnológicos obtidos em cada um dos setores de toda a cadeia de produção avícola. Avanços nas áreas de nutrição, de sanidade e de manejo foram de fundamental importância para a avicultura moderna (Muir e Aggrey, 2003). O maior impacto para o incremento da produção avícola ao longo dos anos tem sido atribuído à seleção genética de animais com perfil zootécnico superior (Muir e Aggrey, 2003; McKay, 2009).

O melhoramento genético de galinhas a partir de seleção dos animais mais produtivos começou no final do século XIX visando a produção de ovos e de carne a partir das raças já existentes (Arthur e Albers, 2003). Até então, as aves eram utilizadas como animais de duplo propósito. Somente ao redor da Segunda Guerra Mundial, com o crescimento de estabelecimentos com maior produção e especialização nos Estados Unidos e Europa, foi que houve um avanço considerável na seleção genética de aves, impulsionado pelos recentes avanços em melhoramento genético de plantas (Barbato, 1999). Isso fez com que a produção de carne, que até então era um produto secundário à produção de ovos (Barbato, 1999), se tornasse um ramo altamente especializado no mercado global (Arthur e Albers, 2003). A eficiência da produção de carne e ovos foi obtida graças ao cruzamento entre raças associado à seleção para características como taxa de postura de ovos, tamanho do ovo, precocidade sexual, longevidade, conversão alimentar, crescimento corporal e deposição muscular (Arthur e Albers, 2003). Como exemplo, a taxa de crescimento de frangos de corte quadruplicou desde os primórdios dos programas de melhoramento genético do início do século XX (Arthur e Albers, 2003). Do mesmo modo, a taxa de conversão alimentar em poedeiras de 1975 a 2009 melhorou de 2,4 gramas para 1,9 gramas de ração por grama de ovo produzido (McKay, 2009), enquanto a indústria de frangos de corte atinge uma conversão atual em torno de 1,6 a 1,8 gramas de ração por grama de carne produzida (Stringhini *et al.*, 2003; Lima, 2010). O melhoramento genético para a obtenção de animais com alta produção de ovos e carne gerou linhagens de galinhas com fenótipos divergentes, uma vez que características

reprodutivas, como produção de ovos, apresentam correlação genética negativa, estimada em -0,54 (Dana *et al.*, 2010), com crescimento corporal dos 14 aos 42 dias (Scholtz *et al.*, 1990; Barbato, 1999; Dana *et al.*, 2010).

O melhoramento genético aplicado focou em características produtivas, mascarando o impacto das características de resistência genética a doenças, uma vez que as enfermidades foram contornadas através de medidas de controle não-genéticos (Bishop *et al.*, 2011). O resultado foi o surgimento de linhagens com características bastantes distintas umas das outras, com impacto não apenas nas características produtivas para as quais foram selecionadas, mas também para outras de alguma forma correlacionadas (Zekarias *et al.*, 2002). Uma das características que sofreu modificação genética devido à seleção genética foi o haplótipo de genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (Gavora *et al.*, 1986; Lakshmanan *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1999; Weigend e Lamont, 1999; Livant *et al.*, 2001). Em aves, o MHC possui forte influência na resistência a doenças (Lillehoj *et al.*, 1990; Bishop *et al.*, 2011), sendo fundamental para a interação de células T e B no sistema imune (Lamont, 1989; Lillehoj *et al.*, 1989). O MHC típico de mamíferos apresenta-se como uma extensa região cromossômica definida pela presença de duas famílias multigênicas altamente polimórficas Vainio, Imhof, 1996 (Vainio e Imhof, 1996). Essas famílias codificam as glicoproteínas de superfície de classes I e II, que reconhecem antígenos específicos e os apresentam a linfócitos T no sistema imune (Vainio e Imhof, 1996). O MHC de galinhas, como será discutido mais adiante, é mais compacto e simples do que o MHC de mamíferos (Lamont, 1989; Vainio e Imhof, 1996; Bishop *et al.*, 2011). A denominação do MHC em galinhas é definida sorologicamente e por rejeição tecidual como o *locus B* (Vainio e Imhof, 1996). Os antígenos de classe I são produzidos pela região B-F, e estão presentes na maioria das células (Lamont, 1989). A região B-L codifica os antígenos de classe II e são restritos aos monócitos, macrófagos, células B e uma pequena parte dos linfócitos T (Lamont, 1989), ou seja, são exclusivos das células apresentadoras de antígenos.

Em galinhas, as características de produção podem estar negativamente relacionadas entre si. Por exemplo, características de crescimento corporal apresentam correlação genética negativa com as características de cunho reprodutivo (Scholtz *et al.*, 1990; Schmidt *et al.*, 1998; Barbato, 1999; Dana *et al.*, 2010). Já animais selecionados para postura apresentaram maior susceptibilidade a infecção por *Salmonella enteritidis* quando comparadas a frangos de corte (Guillot *et al.*, 1995).

Originalmente, todas as raças de galinha moderna usada na indústria avícola são descendentes da raça *Red Jungle Fowl* (Figueiredo *et al.*, 2003b). O desenvolvimento de linhagens para produção de carne ou ovos a partir de uma população base de aves foi possível através de estratégias de seleção diferenciadas utilizadas pelos diferentes programas de melhoramento genético, uma vez que se trata de objetivos de seleção para características genéticas que apresentam correlação negativa (crescimento muscular x taxa de ovulação/produção de ovo). Devido ao fato de que os programas de melhoramento genético sempre direcionaram a seleção para características de desempenho (ganho de peso, conversão alimentar, produção de ovos) pode ter havido seleção indireta para características indesejáveis como menor capacidade de resistência a diversas enfermidades (Swinkels *et al.*, 2007).

É sabido que a cadeia produtiva de alimentos de origem animal faz uso de antimicrobianos ao longo da vida do animal. Na avicultura industrial não é diferente. Tentativas de se produzir aves livres de qualquer uso de quimioterápicos têm sido feitas em granjas de criação livre. Porém, este sistema de criação extensiva apresenta desempenhos subótimos quanto ao crescimento corporal dos animais e à taxa de postura de ovos Lampkin (Lampkin *et al.*, 1997). Na avicultura industrial, diversas enfermidades são controladas com uso diário de medicamentos, muitas vezes adicionados à ração dos animais. A utilização de tais medicamentos apresenta dois aspectos negativos inerentes ao seu uso: a) uma possível restrição à comercialização do produto (Medarova *et al.*, 2003; Goto *et al.*, 2009; Heams *et al.*, 2011); e b) um aumento de custo de produção devido aos custos dos quimioterápicos adicionados à ração (Williams, 1999).

O emprego da genética como forma de amenizar, prevenir ou reduzir o uso de medicamentos apresenta-se como uma possibilidade de ultrapassar barreiras impostas pelo mercado. Cada vez mais, a União Européia vem banindo o consumo de produtos de origem animal contendo resíduos de quimioterápicos, chegando a proibir o uso de antimicrobianos na alimentação animal como promotores de crescimento (Van Dijk *et al.*, 2007). Além da União Européia, vários outros mercados consumidores irão, em um tempo relativamente curto, adotar medidas semelhantes, seja como reflexo de uma sociedade mais exigente quanto à questão alimentar, seja como reflexo de políticas de proteção ao mercado interno da nação (Heams *et al.*, 2011). O uso de linhagens comerciais com maior resistência genética a doenças vem ao encontro desse cenário, visando fornecer as condições necessárias para se reduzir ou, quem sabe, eliminar o uso dos quimioterápicos sem acarretar em perdas de produtividade.

2.2 Linhagens genéticas e resistência a doenças

Muitos pesquisadores vêm tentando elucidar os mecanismos genéticos por trás da resistência a doenças. Uma metodologia empregada tem sido o uso de linhagens genéticas selecionadas para características divergentes. Nesta linha, em 1992, um grupo de pesquisa holandês da Universidade de Wageningen selecionou linhagens de galinhas com base na titulação de anticorpos após imunização com células vermelhas de ovelhas. Os animais foram selecionados para alta e baixa titulação, sendo mantida uma linhagem controle, com acasalamentos ao acaso. Foi estimada a herdabilidade da resposta imune nas aves, tendo-se obtido um índice de 0,19 a 0,49 para as diferentes gerações selecionadas (Pinard-Van Der Laan *et al.*, 1992).

Petry *et al.* (2005) compararam a resistência ao vírus da síndrome respiratória e reprodutiva em suínos (PRRSV) entre uma linhagem selecionada para alto desempenho reprodutivo (linhagem índice - NEI) e outra resultante do cruzamento entre suínos Hampshire e Duroc (HD), selecionados para taxa de crescimento e eficiência de desenvolvimento muscular, i.e., carne magra. Foi demonstrada uma evidência de que variação genética nos mecanismos envolvidos na resposta imune ao PRRSV de fato existe e os animais índice, i.e., de alta fertilidade, apresentaram maior resistência ao PRRSV do que os de alta taxa de crescimento.

Diferentes linhagens de galinhas exibem diferentes graus de resistência a patógenos, incluindo *E. tenella* (Pinard-Van Der Laan *et al.*, 2009). Animais da linhagem selvagem *Fayoumi* são altamente resistentes a *E. tenella* comparadas a linhagens comerciais de postura, como a *White Leghorn* (Pinard-Van Der Laan *et al.*, 1998).

Linhagens de galinhas de alta e baixa taxa de crescimento mostram diferenças na resposta a infecção por *E. acervulina*, com diferenças no padrão de expressão de genes de citocinas (Swinkels *et al.*, 2007), assim como outras duas linhagens de corte, selecionadas durante várias gerações em ambientes nutricionalmente diferentes, mostraram diferenças na resposta imunológica frente às espécies *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella* (Gilbert *et al.*, 2011). No trabalho de Gilbert *et al.* (2011), a proteína componente do complemento 3 (C3), do sistema complemento, foi diferencialmente expressa entre as linhagens A, selecionadas em ambiente nutricional a base de trigo, e B, selecionada sob alimentação com alta concentração de aminoácidos), e sofreu influência da espécie de *Eimeria* infectante. Animais da linhagem B mostraram maior expressão de proteína C3 quando infectadas com *E. acervulina* e *E. maxima* e menor expressão quando infectados com *E. tenella*. O mesmo padrão pode ser observado para as

inibidoras de proteases alfa-2-macroglobulina e serpina 1d. Esses inibidores de proteases apresentaram maior expressão na linhagem B infectada por *E. acervulina* e *E. maxima*. Já quando infectada por *E. tenella*, os níveis de expressão passam a ser maiores nos animais da linhagem A (Gilbert *et al.*, 2011). Curiosamente, a expressão de outras proteínas relacionadas com metabolismo e estresse oxidativo, ligação a ferro, coagulação e proteínas estruturais apresentou um padrão semelhante ao observado em C3 e inibidores de proteases. Em geral, aquelas proteínas mais expressas sob infecção por *E. acervulina* e *E. maxima* tiveram menor expressão sob infecção por *E. tenella* (Gilbert *et al.*, 2011). Com respeito à expressão gênica de citocinas (Swinkels *et al.*, 2007), IL-18, uma citocina pró-inflamatória, apresentou expressão aumentada logo ao primeiro dia pós-infecção na linhagem de rápido crescimento, enquanto que só atingiu expressão aumentada na linhagem de crescimento lento com 3 dias de infecção, comparada a animais da mesma linhagem não infectados. Concluiu-se que frangos de corte de linhagem de rápido crescimento demonstraram resposta mais cedo para IL-8, IL-18, TCR $\gamma\delta^+$, CD3 $^+$, CD8 α^+ do que os de crescimento lento, o que pode ser reflexo do desenvolvimento acelerado do sistema imune intestinal dos animais de rápido crescimento.

Em estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa, Bertani *et al.* (2005) verificaram diferenças na mortalidade entre três linhagens de galinhas após infecção por *E. tenella*. Nesse estudo – que fundamentou a presente investigação de expressão gênica –, mostrou-se que a linhagem CC, selecionada para postura, i.e., maior número de ovulações, foi mais resistente à infecção por *Eimeria tenella* do que a selecionada para corte, possuidora de altas taxas de crescimento e de desenvolvimento muscular. Uma terceira linhagem (CCc) também foi avaliada e não apresentou diferença na mortalidade comparada às outras duas linhagens, sendo intermediária a elas. Essa linhagem é composta por animais da linhagem CC que não sofreram seleção para nenhuma característica e os acasalamentos foram realizados ao acaso sendo, portanto, um controle genético da linhagem CC.

2.2.1 População experimental da Embrapa

Em 1999, pesquisadores da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia-SC, iniciaram o Projeto Brasileiro de Genômica da Galinha. O objetivo primordial foi o estudo de mecanismos genéticos responsáveis por características de produção, especialmente desempenho e carcaça.

Uma das linhagens desenvolvidas pela Embrapa Suínos e Aves foi a TT, oriunda do cruzamento de animais das raças *New Hampshire*, *White Plymouth Rock* e *White Cornish*. Essa linhagem é uma linha macho, cujo objetivo de seleção foi melhorar peso vivo, conversão alimentar, consumo de ração e rendimento de carcaça (Figueiredo *et al.*, 2003a). Os animais apresentam, portanto, alta taxa de crescimento e desenvolvimento muscular. Outra linhagem desenvolvida foi a CC, obtida a partir da raça *White Leghorn*, selecionando animais para alta taxa de postura de ovos, peso e qualidade do ovo, viabilidade, maturidade sexual, fertilidade, eclobilidade e redução do peso vivo (Figueiredo *et al.*, 2003b).

Uma terceira linhagem desenvolvida foi a linhagem CCc. Tal linhagem consiste em animais base da linhagem CC, mantidas com sistema de acasalamento ao acaso, ou seja, sem pressão de seleção alguma (Figueiredo *et al.*, 2003b), sendo, portanto, um controle genético de CC.

Estudos de *loci* para características quantitativas (QTL) foram desenvolvidos com o cruzamento de TT com CC. Diversos QTLs para características de ganho de peso e carcaça foram encontrados no cromossomos 1 (Nones, 2004; Nones *et al.*, 2006), 2 (Baron, 2004; Ambo *et al.*, 2009), 3 (Ruy, 2004), 4 (Baron, 2004; Ambo *et al.*, 2009), 11 e 13 (Boschiero *et al.*, 2009). Entretanto, nenhum estudo foi conduzido, até então, a fim de avaliar o perfil de resistência genética a doenças nestas linhagens. O fato das características de crescimento corporal possuírem correlação genética negativa com fertilidade e sanidade em galinhas, traz a idéia de que animais selecionados para ganho de peso possam apresentar diferentes capacidades de resistência a patógenos comparados a animais selecionados para características reprodutivas. A esse tipo de seleção é que foram submetidos, respectivamente, os animais TT e CC.

Em estudo anterior, animais TT, CC e CCc, foram desafiados com oocistos de *Eimeria tenella* e foram avaliados quanto as características de resistência a coccidiose (Bertani *et al.*, 2005). Nesse trabalho verificou-se maior índice de mortalidade em animais da linhagem de rápido crescimento (TT) comparados aos de alta fertilidade (CC).

Esses trabalhos mostram que existe uma variação genética a ser explorada para a obtenção de linhagens resistentes a doenças. Além disso, estes mesmos estudos comprovam que a seleção genética para características produtivas exerce efeito em características de resistência a doenças.

2.3 Coccidiose Aviária

A coccidiose é a doença parasitária mais importante na avicultura moderna (Pinard-Van Der Laan *et al.*, 2009) podendo atingir qualquer tipo de sistema de criação independente dos mais recentes avanços da tecnologia em termos de tratamento, manejo, nutrição e genética. Tem sido controlada principalmente por drogas anticoccidianas e quimioterápicos adicionados à ração (Costa *et al.*, 2000; Medarova *et al.*, 2003; Pinard-Van Der Laan *et al.*, 2009), gerando perdas econômicas decorrentes do uso desses medicamentos (Williams, 1999), e pela redução da produtividade refletida como ganho de peso reduzido, conversão alimentar deficiente e morte em alguns casos (Medarova *et al.*, 2003). Nas criações, pode ser inaparente quando as aves são infectadas com baixa carga infectante, ou severa quando houver a ingestão de milhões de oocistos. Diversos aspectos biológicos são importantes nessa doença, tais como o ciclo evolutivo do parasita, a sua relação com o hospedeiro e a relação da interação hospedeiro-parasita de acordo com a genética das aves. Muitos estudos têm sido conduzidos na tentativa de se solucionar o problema da infecção das aves por este parasita; no entanto o problema ainda persiste nos dias atuais (Medarova *et al.*, 2003; Lillehoj *et al.*, 2005; Jorgensen *et al.*, 2006; Suo *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006; Shah *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2010; Wallach, 2010; Awais *et al.*, 2011; Constantinoiu *et al.*, 2011; Del Cacho *et al.*, 2011; Geriletu *et al.*, 2011; Gilbert *et al.*, 2011; Sumners *et al.*, 2011).

2.3.1 Etiologia e aspectos clínicos

Existem ao todo sete espécies do gênero *Eimeria* que afetam a galinha doméstica, causando a coccidiose: *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. brunetti* e *E. necatrix*. As espécies *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella* são os três tipos mais comuns em frangos de corte (Cornelissen *et al.*, 2009), seguidos por *E. mitis* e *E. praecox*. *E. brunetti*, possivelmente não ocorre no Brasil e a *E. necatrix* é causa comum de coccidiose em matrizes.

Cada espécie de *Eimeria* apresenta especificidade quanto ao sítio de infecção no intestino (Figura 1), afetando principalmente as células da cripta e vilosidades.

Eimeria acervulina parasita as células do duodeno e do jejuno causando coccidiose subclínica com comprometimento da absorção de nutrientes, da conversão alimentar e do ganho de peso das aves (Costa, 2000).

E. maxima parasita as regiões do duodeno, do jejuno e do divertículo, comprometendo a absorção de nutrientes, a conversão alimentar e o ganho de peso.

Além da forma subclínica, também pode causar coccidiose clínica com mortalidade em infecções mais severas (Costa, 2000).

Eimeria tenella parasita as células epiteliais, principalmente, das criptas do ceco e porções próximas do reto, causando coccidiose subclínica com redução na concentração plasmática de minerais, proteínas, carotenóides e lipídios, assim como redução do hematócrito e da hemoglobina associados à dificuldade de ganhar peso piorando a conversão alimentar (Conway *et al.*, 1993). Essa espécie também é causa comum de coccidiose clínica levando à mortalidade.

Eimeria mitis parasita as células epiteliais das criptas e das vilosidades, principalmente das porções posteriores ao divertículo, onde, apesar de não causar lesões macroscópicas (Williams *et al.*, 1996), causa atrofia das vilosidades e redução do ganho de peso, da absorção de glicose e de metionina (Costa, 2000). Os níveis plasmáticos de caroteno também são reduzidos em aves infectadas por *E. mitis*. Desse modo, a espécie causa coccidiose subclínica em aves infectadas.

Eimeria praecox parasita as células epiteliais das vilosidades do intestino delgado anterior, principalmente do duodeno, podendo causar coccidiose subclínica mesmo com ausência de lesões macroscópicas. Em casos de infecções pesadas, a espécie compromete significativamente o ganho de peso das aves (Gore e Long, 1982).

A espécie *E. tenella* foi escolhida como objeto de estudo neste trabalho por ser um dos três principais agentes etiológicos da coccidiose em aves e por, até onde temos conhecimento, inexistirem estudos relacionados à caracterização fenotípica de linhagens de aves e de expressão gênica em animais por ela infectados. Evitou-se, assim, a sobreposição de esforços com outros grupos de trabalho que já conduzem estudos similares relacionados a *E. acervulina* e *E. maxima* (Zhu *et al.*, 2000; Min *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2006c).

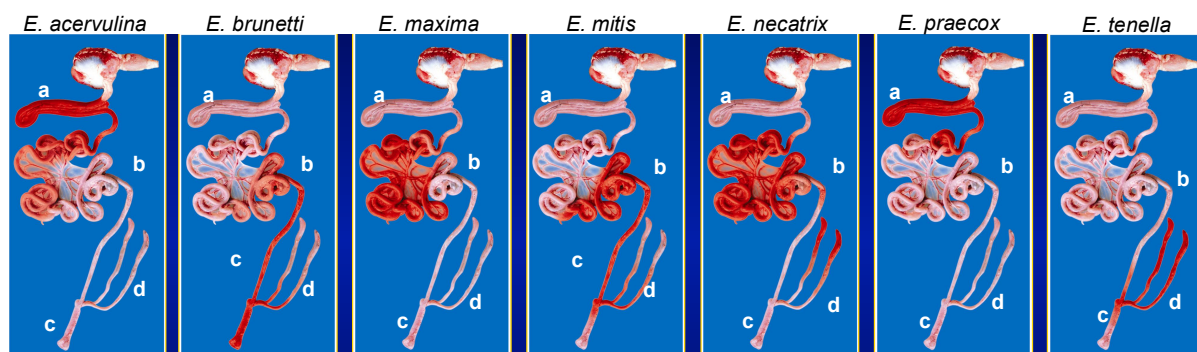


Figura 1. Local de infecção (em vermelho forte) por espécie de *Eimeria* spp. no intestino de galinha. (fonte: Coccilab USP). a) duodeno; b) intestino delgado; c) intestino grosso; e d) cecos.

2.3.2 Ciclo de vida de *Eimeria* spp.

O ciclo de vida das espécies de *Eimeria* spp. é ilustrado na Figura 2. O oocisto maduro (1) é eliminado nas fezes do animal na forma de oocisto esporulado (2), liberando os esporozoítos ao ser ingerido (3). Estes penetram nas células epiteliais das vilosidades (4) e invadem linfócitos intraepiteliais, sendo levados para a lâmina própria e células epiteliais das criptas (Trout e Lillehoj, 1996) onde completam a primeira geração de merontes ou esquizontes (reprodução assexuada) (5-8) (Levine, 1985; Vervelde *et al.*, 1995). Os merontes possuem um número variável de merozoítos no seu interior (8) (Levine, 1985; Vervelde *et al.*, 1995), que rompem a célula (9) e vão infectar novas células, dando origem a uma nova geração de merontes (Levine, 1985; Vervelde *et al.*, 1995). Os merozoítos podem repetir esse ciclo até a quarta geração (10 e 11) (Min *et al.*, 2004), ou podem dar início à reprodução sexuada (Levine, 1985; Vervelde *et al.*, 1995). Por esse processo os merozoítos geram microgametócitos, masculinos (13), e macrogametócitos, femininos (14) (Levine, 1985; Vervelde *et al.*, 1995). O zigoto formado a partir da fertilização dos macrogametas (17) pelos microgametas desenvolve uma parede dupla dando origem ao oocisto não esporulado (18) (Levine, 1985; Vervelde *et al.*, 1995). Os oocistos rompem a célula e são eliminados no ambiente através das fezes da galinha (19) (Levine, 1985; Vervelde *et al.*, 1995).

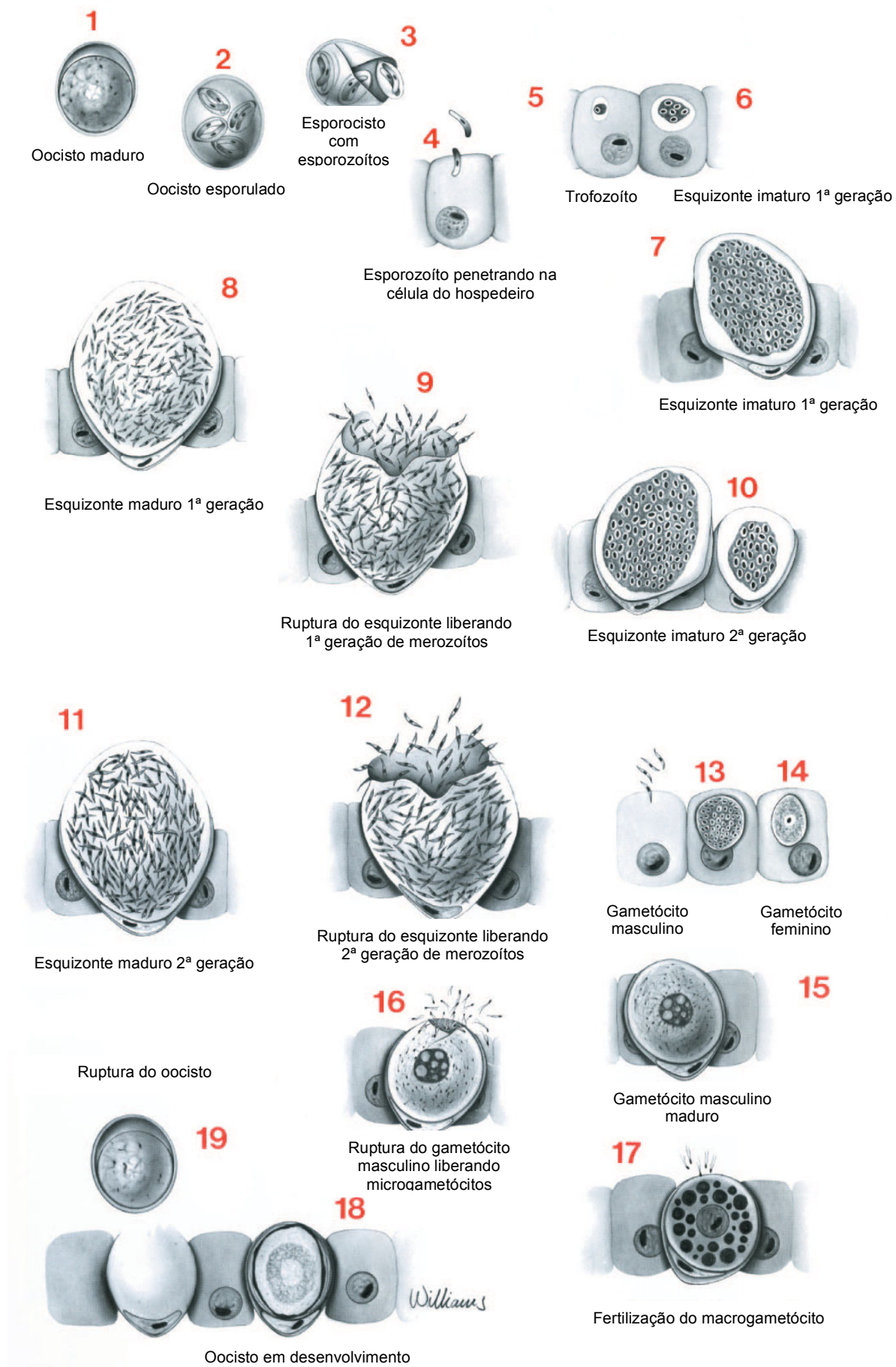


Figura 2. Ciclo de vida e infecção de *Eimeria* spp. (adaptado de Conway, McKenzie, 2007)

2.4 Imunologia das aves

A resposta de um organismo frente a patógenos é resultado da ação do sistema imune de um organismo (Murphy *et al.*, 2008), que em um primeiro momento advém de respostas do sistema imune inato e mais tardiamente da resposta do sistema imune adaptativo (Abbas *et al.*, 2010).

Segundo Murphy *et al.* (2008) para um indivíduo de fato sobrepujar alguma doença, o sistema imune precisa cumprir quatro tarefas principais. Primeiramente, o sistema imune precisa ser capaz de reconhecer imunologicamente uma infecção, o que se dá através das células brancas do sistema imune inato num primeiro momento e mais tarde pelos linfócitos do sistema imune adaptativo. Uma vez reconhecida, a infecção deve ser contida e, se possível, eliminada, através das funções imunes efetoras como as proteínas do sistema complemento, anticorpos, e da capacidade destrutiva dos linfócitos e outras células brancas. A ação imune deve ser mantida sob controle para não ocasionar danos aos tecidos próprios do organismo. Logo, ela deve ser capaz de sofrer regulação. Finalmente, o sistema imune deve ser capaz de proteger um indivíduo de infecções recorrentes de um mesmo patógeno. Esta última característica torna possível a vacinação e é fruto da memória imunológica do sistema imune adaptativo. Desenvolver métodos de memória imunológica duradoura contra patógenos que normalmente não provocam tal memória é um dos maiores desafios dos imunologistas (Murphy *et al.*, 2008).

2.4.1 Tecidos do sistema imune

Os diversos tipos celulares que constituem o sistema imune têm origem em tecidos linfomielóides e são encontrados em órgãos linfoides centrais e periféricos (Oláh e Vervelde, 2008). Nas aves, células-tronco hematopoiéticas migram para os órgãos linfoides centrais como o timo e a *Bursa de Fabricius*, e se desenvolvem, respectivamente, a células T e B imunologicamente competentes (Oláh e Vervelde, 2008), também denominados linfócitos T e B. A *Bursa de Fabricius*, um órgão exclusivo de aves, foi o local onde primeiro se teve notícia de desenvolvimento das células B, daí a sua denominação. Os tecidos linfoides secundários desenvolvem-se a partir da colonização conjunta de linfócitos T e B em outros locais, seguido de uma separação entre áreas distintas ocupadas por cada tipo celular (Oláh e Vervelde, 2008). Com a separação dessas áreas, células não-linfoides começam a povoar sítios específicos desses órgãos. Essas células não-linfoides são as células epiteliais, endoteliais e também os macrófagos e células dendríticas (DC, do inglês, *dendritic cell*) (Oláh e Vervelde, 2008).

O timo é o tecido linfoide central responsável pela produção de linfócitos T (Love e Bhandoola, 2011). Nele, a região cortical é densamente povoada por células T precursoras, os timócitos (Oláh e Vervelde, 2008). Um número moderado de macrófagos também pode ser visto na região do córtex. Linfoblastos grandes e pequenos encontram-se dispostos abaixo da região epitelial (Oláh e Vervelde, 2008). Muitos desses linfoblastos encontram-se na fase S (fase de síntese) do ciclo celular, sugerindo que essa região subcapsular do timo seja o principal sítio de proliferação de células T (Oláh e Vervelde, 2008). Durante a maturação dos linfócitos T, as células migram em direção à borda córtico-medular onde macrófagos e células dendríticas sentinelas selecionam os timócitos antes desses ganharem a circulação sanguínea (Oláh e Vervelde, 2008). A borda córtico-medular é composta por uma barreira de células dendríticas que expressam antígeno para o complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II e de células peroxidase-positivas com grânulos. Ambos os tipos celulares desempenham papel na seleção dos timócitos que ganharão a corrente sanguínea (Oláh e Vervelde, 2008; Love e Bhandoola, 2011).

O termo “linfócito B” é devido a esse tipo celular ser derivado da bursa (em inglês, *bursa-derived lymphocyte*) (Oláh e Vervelde, 2008), embora o termo possa ser igualmente referente à sua origem e maturação na medula óssea de mamíferos (Pinchuk, 2002). A *bursa de Fabricius* é um órgão linfoide central exclusivo de aves, no qual foi primeiro identificado o papel de produção de anticorpos. Aves que haviam sido bursectomizadas mostraram-se incapazes de produzir anticorpos contra o antígeno “O” de *Salmonella* spp. (Oláh e Vervelde, 2008). O achado acidental feito por Bruce Glick e Timothy demonstrou que o local de produção de linfócitos B (aqueles capazes de produzir anticorpos) seria de fato a *bursa de Fabricius* (Glick *et al.*, 1956). Pelo menos 98% dos linfócitos presentes na *bursa* são células B, e raríssimos linfócitos T são vistos no seu córtex (Oláh e Vervelde, 2008). As células B proliferam tanto no córtex quanto na medula da *bursa* e com 8 a 10 semanas de idade da ave, a população de linfócitos B começa a decair, indicando a involução do órgão – um processo que se completa em torno dos 6 a 7 meses de vida (Oláh e Vervelde, 2008). Isso significa que, pelo menos no caso de aves de corte, abatidas aos 42 dias de idade, a *bursa* é funcional durante toda a vida do animal. Macrófagos e células dendríticas secretórias fazem parte das células não-límfoides encontradas na *bursa*.

As células imunologicamente maduras formadas no timo e *bursa de Fabricius* ganham a circulação sanguínea para colonizar os tecidos linfoides periféricos como baço

e os tecidos linfoides associados ao intestino, brônquios e pele (Oláh e Vervelde, 2008). Nestes tecidos linfoides periféricos, as populações de linfócitos T e B ocupam compartimentos distintos, referenciados como zonas T- e B-dependentes (Oláh e Vervelde, 2008). Tais tecidos não são capazes de produzir linfócitos, mas sim maturá-los, o que ocorre de maneira antígeno-específica (Oláh e Vervelde, 2008).

O baço é formado pelas polpas vermelha e branca. A primeira tem função hematopoiética inicial, passando para a função de filtrar eritrócitos senescentes (Oláh e Vervelde, 2008). Além de eritrócitos, a polpa vermelha apresenta inúmeras células T que ocupam o espaço em torno da artéria esplênica central, formando uma lâmina linfática peri-arteriolar (PALS, do inglês, *peri-arteriolar lymphatic sheath*) (Oláh e Vervelde, 2008). Essa região é denominada a zona T-dependente do baço (Oláh e Vervelde, 2008). A polpa branca é desprovida de eritrócitos e predominantemente povoada por linfócitos, com duas áreas morfológicamente distintas: (1) PALS, ao redor das artérias centrais e a (2) polpa branca peri-elipsóides (PWP, do inglês *peri-ellipsoids white pulp*) em torno do capilares e considerada a zona B-dependente do baço (Oláh e Vervelde, 2008).

A galinha apresenta um tecido linfoide difuso capaz de se desenvolver onde quer que ocorra estimulação antigênica (Oláh e Vervelde, 2008). Uma das primeiras barreira contra patógenos, e, conseqüentemente, um alvo primário de antígenos é a mucosa. Assim, a galinha desenvolveu um extenso tecido linfoide associado à mucosa (MALT, do inglês *mucosae associated lymphoid tissue*), no qual se inclui o tecido linfoide associado ao intestino (GALT, do inglês *gut associated lymphoid tissue*) (Lillehoj e Lillehoj, 2000; Oláh e Vervelde, 2008). Diversos tecidos linfoides são observados ao longo de todo o trato intestinal da galinha: tonsilas cecais, placas de Peyer, divertículo de Meckel, tonsilas pilórica e esofágica, além de aglomeração linfoide na faringe e cloaca e da própria *bursa de Fabricius* descrita acima (Oláh e Vervelde, 2008). A maturação dos linfócitos no GALT também é dependente de estímulo antigênico e galinhas criadas em ambientes livre de patógenos apresentam completa ausência de folículos linfoides nas tonsilas cecais, embora nenhuma diferença de peso de *bursa*, timo ou baço tenha sido observado comparando-se esses animais àqueles criados de maneira convencional (Oláh e Vervelde, 2008).

O desenvolvimento do GALT se inicia na lâmina própria das vilosidades, por onde aportam macrófagos e linfócitos, que iniciam a formação de regiões distintas de células T e B (Oláh e Vervelde, 2008). Histologicamente, o GALT é disposto em camadas. A camada externa é constituída de células epiteliais e linfócitos situados acima da

membrana basal. A camada interna, abaixo da membrana basal, é formada pela lâmina própria, também contendo linfócitos, e pela submucosa (Lillehoj e Lillehoj, 2000). Nos tecidos linfoides associados ao intestino, vários órgãos linfoides e vários tipos de células, como epiteliais, linfócitos, células apresentadoras de antígenos (APC) e *natural killers* (NK), se desenvolvem a fim de proteger as galinhas de patógenos intestinais (Lillehoj e Lillehoj, 2000). Os antígenos ingeridos via oral são absorvidos por células epiteliais modificadas (membranosas ou M) e transportados aos compartimentos linfoides das placas de Peyer. Aí esses antígenos são processados e apresentados por células APC que expressam MHC de classe II aos linfócitos B e T (Lillehoj e Lillehoj, 2000). Os linfócitos ativados então migram das placas de Peyer para a lâmina própria e para o epitélio onde funcionam como células efetoras da resposta imune (Lillehoj e Lillehoj, 2000). O GALT forma a primeira linha de defesa contra infecção por *Eimeria* spp. com componentes não-específicos e específicos (linfócitos e anticorpos) (Lillehoj e Lillehoj, 2000).

Os tecidos linfoides centrais e periféricos apresentam uma coleção de células linfoides, como os linfócitos T e B e células NK, e células não-linfoides que desempenham papel crucial para o sistema imunológico (Oláh e Vervelde, 2008). Conjuntamente, essas células são responsáveis por conferir imunidade, ou pelo menos, iniciar uma resposta imune, contra uma ampla gama de patógenos e antígenos. Algumas células são altamente específicas quanto ao seu antígeno alvo, agindo de forma eficaz somente contra ele. Outras apresentam a capacidade de promover resposta imune frente a uma grande variedade de patógenos, de vírus a parasitas, agindo com um nível de especificidade muito menor. Esse tipo de resposta imune inespecífica é conhecida como imunidade inata, enquanto o primeiro tipo de resposta, com alta especificidade, é denominado imunidade adquirida (Juul-Madsen *et al.*, 2008; Murphy *et al.*, 2008).

2.4.2 Resposta imune inata

A defesa contra patógenos inicia por uma série de reações da imunidade inata e, mais tardiamente, pelas respostas da imunidade adquirida (Abbas *et al.*, 2010).

A imunidade inata promove uma resposta rápida e poderosa a infecções no intuito de prevenir ou limitá-las e consiste em mecanismos celulares e bioquímicos que podem estar funcionais antes mesmo da infecção ocorrer (Paul, 2008). Os principais componentes do sistema imune inato incluem: as barreiras físicas e químicas, como epitélio e substâncias antimicrobianas por ele produzidas; células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos) e células *natural killer*; proteínas plasmáticas, como as do sistema

complemento; e as citocinas, proteínas que regulam e coordenam muitas das atividades das células da imunidade inata (Abbas *et al.*, 2010). Alguns desses componentes imunes estão constantemente funcionais, como é o caso de todo o sistema de revestimento dos tecidos, enquanto outros estão normalmente inativos, mas de prontidão para iniciar a resposta na presença de patógenos (Abbas *et al.*, 2010). Muitas células do sistema imune inato, como os neutrófilos, macrófagos e células *natural killer* (NK), atuam de modo direto na célula infectada ou no agente infeccioso, sendo fundamental para combate a agentes infecciosos intracelulares (Cornelissen *et al.*, 2009).

2.4.2.1 Receptores do sistema imune inato

Os mecanismos da imunidade inata atuam somente sobre patógenos e produtos de células que sofreram lesão e respondem essencialmente da mesma maneira em repetidas infecções, reconhecendo grupos de estruturas moleculares que são característicos de vários patógenos, os padrões moleculares associados a patógeno (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*), e sem fazer uma distinção refinada entre diferentes substâncias (Abbas *et al.*, 2010). Logo, a resposta imune inata é classificada como uma resposta imune não-específica. Os PAMPs são estruturas conservadas de diversas classes diferentes de patógenos (Dalmo e Bøggwald, 2008). Vírus, bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos e protozoários intracelulares apresentam diferentes PAMPs (Abbas *et al.*, 2010). Essas estruturas podem ser ácido nucléico exclusivo de microrganismos, como RNA de fita dupla de alguns vírus, regiões de dinucleotídeos citosina e guanina (CpG) não metiladas no DNA de bactérias, proteínas, lipídios e carboidratos presentes apenas em microrganismos como os lipossacarídeos (LPS) da membrana de bactérias gram-negativas, ácido teicóico de bactérias gram-positivas e oligossacarídeos ricos em manose, encontrado em vários micróbios e não em vertebrados (Abbas *et al.*, 2010). Interessante notar que as estruturas às quais o sistema imune inato adaptou-se a identificar como alvo nos microrganismos são, via de regra, essenciais para a sobrevivência do patógeno. Isso é uma característica evolutiva muito importante pois assegura que o micróbio não irá descartar esses produtos-alvo (Abbas *et al.*, 2010). Esse mecanismo também permite o reconhecimento de “próprio” e “não-próprio” ao organismo pela imunidade inata, evitando a destruição de células próprias saudáveis (Murphy *et al.*, 2008).

O reconhecimento de padrões moleculares pelo sistema imune inato inclui receptores de padrões associados à célula expressos na superfície ou no interior de diversos tipos celulares aumentando as chances de ativar funções pro-inflamatória e

antimicrobiana nas células em que essas características são expressas (Abbas *et al.*, 2010). Esses receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *pattern recognition receptors*) (Murphy *et al.*, 2008) ocorrem em macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, linfócitos, e também em outras células como as células epiteliais (Abbas *et al.*, 2010). Um mesmo repertório desses PRRs estão presentes em todas as células de um mesmo tipo celular e promovem resposta ao antígeno sem ocasionar o atraso imposto pela necessidade de ativação de linfócitos da imunidade adquirida (Murphy *et al.*, 2008). As proteínas dos PRRs podem atuar como moléculas secretadas pela célula (Murphy *et al.*, 2008) e estão presentes na superfície celular, vesículas endossômicas e no citoplasma, de prontidão para reconhecer microrganismos em quaisquer desses compartimentos (Abbas *et al.*, 2010). Os PRRs estão ligadas a transdução de sinais intracelulares que ativam diversas respostas celulares como a indução de moléculas inflamatórias e antimicrobianas (Abbas *et al.*, 2010). As principais classes de PRRs incluem os receptores de lectina ligantes a manose (MBL, do inglês *mannose binding lectin*), lectinas tipo C (dependentes de cálcio), e receptores semelhantes a *Toll* (TLR, do inglês *toll-like receptor*) (Murphy *et al.*, 2008).

As lectinas ligantes a manose (MBLs) são proteínas livres no plasma sanguíneo, ricas em cisteínas (Bergman, 2011), capazes de reconhecer orientações específicas de certos resíduos de sacarídeos, presentes apenas em células microbianas, além do espaçamento entre eles (Murphy *et al.*, 2008; Bergman, 2011). O complexo MBL-patógeno se liga a fagócitos, seja por interações entre o fagócito e o MBL ou por receptores de complemento que também se complexam ao patógeno (Murphy *et al.*, 2008). O complexo realiza a opsonização, que consiste em “cobrir” o patógeno com proteínas que facilitam a fagocitose, resultando na morte do patógeno, após fagocitose, e indução de outras respostas celulares, como as quimiocinas (Murphy *et al.*, 2008), descritas mais adiante. Outros mecanismos de reconhecimento de patógenos também se utilizam da opsonização para facilitar a fagocitose dos microrganismos (Murphy *et al.*, 2008).

Os fagócitos são também equipados com receptores de superfície que reconhecem diretamente o patógeno, como o receptor de manose de macrófagos. Esse receptor é um receptor lectina tipo C (dependente de cálcio) que reconhece açúcares específicos de microrganismos, agindo de forma semelhante ao MBL, mas, por ser uma proteína transmembrana, pode atuar diretamente como um receptor fagocítico (Murphy *et al.*, 2008).

O estímulo de certos receptores pelos produtos de patógenos não só estimulam a fagocitose, como também induzem a produção de moléculas co-estimulatórias em macrófagos e células dendríticas que as permitem atuar como células apresentadoras de antígenos para linfócitos T, recrutar novas células efetoras e iniciar a resposta imune adaptativa (Murphy *et al.*, 2008). Talvez o melhor exemplo desse tipo de receptor seja os receptores transmembrana do semelhantes a *Toll* (Murphy *et al.*, 2008; Bergman, 2011).

Os receptores semelhantes a *Toll* (TLRs) são altamente conservados e têm a função de ativar a defesa do hospedeiro através de uma série de vias de sinalização que opera em praticamente todos os organismos multicelulares (Cormican *et al.*, 2009). O TLR permite a iniciação da respostas imune inata e adaptativa por ativar a transcrição do fator nuclear kappaB (NF- κ B, do inglês *nuclear factor kappa B*) (Bergman, 2011), um fator de transcrição que, por sua vez, induz a transcrição de diversos genes, incluindo citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimulatórias que têm a função essencial de direcionar o curso da resposta imune adaptativa (Murphy *et al.*, 2008).

Alguns TLRs atuam como receptores de membrana celular, enquanto outros atuam de modo intracelular, nas membranas de endossomos, onde reconhecem patógenos intracelulares, ou internalizados por endocitose (Murphy *et al.*, 2008). A sinalização feita pelos TLRs se dá pela indução do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , do inglês *tumor necrosis factor alpha*), no caso de TLR-4, e do interferon-beta (IFN- β) pelo TLR-2 (Murphy *et al.*, 2008). Outro TLR, o TLR-3, é reconhecido como capaz de responder a infecções virais através da identificação de RNA de fita dupla de alguns vírus e induzir a produção de interferon-gama (IFN- γ) (Murphy *et al.*, 2008).

Enquanto os TLRs encontram-se ligados a membranas, seja ela a membrana celular ou membranas das organelas intracelulares, outro grupo de proteínas encontradas livres no citoplasma possuem a capacidade de se ligar a proteínas microbianas e ativar NF- κ B, iniciando assim a mesma reação induzida pelos TLRs. Tais proteínas são conhecidas como NOD-1 e NOD-2 por conter um domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos (a sigla segue a denominação em inglês, *nucleotide-binding oligomerization domain*) (Murphy *et al.*, 2008). Essas proteínas também contêm domínios de recrutamento de uma família de proteases intracelulares denominadas caspases (Murphy *et al.*, 2008). Esse domínio, conhecido como CARD (do inglês, *capase activation and recruitment domain*) também está presente em outro grupo de proteínas intracelulares induzidas por ácido retinóico (RIG-1, do inglês *retinoic acid inducible gene-1*) (Abbas *et al.*,

2010). O domínio CARD, além de estimular a produção de NF- κ B, também ativa o fator de transcrição de interferon (IRF, do inglês *interferon releasing factor*) que estimula a expressão de interferon do tipo I (IFN- α e - β) (Abbas *et al.*, 2010).

Além de receptores associados a células, o sistema imune inato possui proteínas solúveis circulantes no plasma e fluidos extra-celulares que também reconhecem PAMPs, servindo como moléculas efetoras do sistema imune inato (Abbas *et al.*, 2010). Essas proteínas são consideradas o ramo humoral da imunidade inata (Murphy *et al.*, 2008) e seus principais representantes são as proteínas do sistema complemento, as colectinas, pentraxinas e ficolinas (Abbas *et al.*, 2010).

O sistema complemento pode ser ativado através de 3 vias distintas: (1) via clássica; (2) via alternativa e (3) via das lectinas. A via clássica, assim chamada por ter sido a primeira a ser descoberta, utiliza uma proteína plasmática chamada C1 para detectar anticorpos IgM, IgG1 ou IgG3 (Ig, abreviação para imunoglobulinas) ligados à superfície microbiana (Dzik, 2010). A via alternativa é acionada por meio do reconhecimento direto de estruturas da superfície microbiana pelo fragmento C3b, com participação de dos fatores B, D e properdina (Dzik, 2010). Embora descoberta depois da via clássica, a via alternativa é filogeneticamente mais antiga (Abbas *et al.*, 2010; Dzik, 2010). A via da lectina é ativada por uma MBL circulante ligada a um microrganismo ativando uma das proteínas da via clássica de ativação do complemento, mas na ausência de imunoglobulinas, através de uma serina protease associada a ela (Abbas *et al.*, 2010).

Qualquer uma das três vias acima levam ao recrutamento e agrupamento sequencial de outras proteínas do sistema complemento em um complexo de proteases (Abbas *et al.*, 2010; Dzik, 2010). A proteína central do sistema, C3, é clivada em dois fragmentos: um maior, C3b, e outro menor, C3a (Abbas *et al.*, 2010; Dzik, 2010). O fragmento maior, C3b, é depositado sobre a superfície microbiana onde o sistema complemento foi ativado e promove a opsonização do microrganismo, o que favorece a sua fagocitose (Abbas *et al.*, 2010). O fragmento C3a, por sua vez, é liberado servindo como estimulador da inflamação e um quimioatrativo para neutrófilos (Abbas *et al.*, 2010). C3b se complexa a outras proteínas do complemento, formando uma sistema de protease que cliva a proteína C5, liberando sua subunidade menor, C5a, e mantendo a subunidade maior, C5b, ligada à membrana microbiana. C5a estimula o aporte de neutrófilos ao sítio de infecção. C5b inicia a formação do complexo de ataque à membrana (MAC, do inglês *membrane attack complex*), constituído de proteínas do complemento C6, C7, C8 e C9, que são reunidos em um poro na membrana, levando a lise celular (Abbas *et al.*, 2010).

A família de proteínas solúveis pentraxina são proteínas pentaméricas que reconhecem estruturas microbianas. Nessa família encontram-se a proteína C reativa (CRP, do inglês *C-reactive protein*), amilóide P sérico (SAP, do inglês *serum amyloid P*) (Dzik, 2010) e a pentraxina longa PTX3 (Abbas *et al.*, 2010). As concentrações plasmáticas de CRP e hepáticas de SAP aumentam drasticamente em indivíduos infectados através do estímulo das interleucinas IL-6 e IL-1 produzidas por fagócitos ativados como parte da resposta imune inata (Abbas *et al.*, 2010). Tanto CRP como SAP são proteínas de fase aguda conhecidas por aderir a membranas de bactérias e fungos (Abbas *et al.*, 2010). CRP age como uma opsonina ao se ligar a proteína C1q do complemento e também pode induzir a ativação do sistema complemento pela via clássica ao se ligar à C1q (Abbas *et al.*, 2010). PTX3 é produzida por diversas células como macrófagos, células dendríticas e epiteliais em resposta a ligantes de TLR e ao fator TNF e se liga a várias estruturas como a proteína C1q, células apoptóticas, e alguns microrganismos (Abbas *et al.*, 2010).

Colectinas e ficolinas são proteínas plasmáticas estruturalmente semelhantes entre si. A primeira possui uma cauda semelhante a colágeno conectada a uma região lectina dependente de cálcio enquanto a segunda contém um domínio de reconhecimento de carboidratos semelhante a fibrinogênio em vez de lectina (Dzik, 2010). Ambas atuam como fatores de opsonização microbiana e atuam ativando o sistema complemento pela via clássica através da proteína C1q (Abbas *et al.*, 2010).

Alguns peptídeos produzidos em células epiteliais e alguns leucócitos apresentam propriedades antimicrobianas (Iwasaki, 2007). Duas classes principais desses peptídeos são conhecidas: as defensinas (Sugiarto e Yu, 2004) e as catelicidinas (Oppenheim *et al.*, 2003). Defensinas são peptídeos pequenos com três cadeias internas contendo pontes dissulfeto cuja localização define as famílias α , β e ϕ (Abbas *et al.*, 2010). Defensinas são produzidas por células epiteliais, bem como por leucócitos portadores de grânulos, como células NK e linfócitos T citotóxicos (Milona *et al.*, 2007; Abbas *et al.*, 2010). Algumas defensinas são expressas constitutivamente pela célula e têm sua expressão aumentada por citocinas, enquanto outros são induzidas por intermédio da ação de citocinas (Abbas *et al.*, 2010). A ação antimicrobiana das defensinas envolve tanto a citotoxicidade direta contra os microrganismos, quanto a ativação de células envolvidas na resposta inflamatória contra micróbios (Ganz, 2003; Sugiarto e Yu, 2004).

Catelicidinas são expressas por neutrófilos e uma série de células epiteliais, como células da pele, das mucosas gastrointestinal e respiratória (Cederlund *et al.*, 2011). Tais

proteínas são produzidas de modo precursor, sendo clivadas em 2 fragmentos, o que pode ser estimulado por citocinas inflamatórias e produtos microbianos (Abbas *et al.*, 2010). O fragmento C-terminal apresenta toxicidade frente a diversos patógenos e podem ativar a resposta de leucócitos e outros tipos celulares para a erradicação do microrganismo (Oppenheim *et al.*, 2003).

2.4.2.2 Células do sistema imune inato

A maioria das células do sistema imune inato tem origem na medula óssea e migram aos órgãos imunes onde se desenvolvem (Abbas *et al.*, 2010). As células podem ser divididas em duas linhagens, de acordo com sua origem: (a) mielóide, como os neutrófilos, macrófagos e células dendríticas; ou (b) linfocitária, como células *natural killer* (NK) e duas subpopulações de linfócitos B-1 e T portadores de receptor $\gamma\delta$ (Abbas *et al.*, 2010).

2.4.2.3 Fagócitos: neutrófilos e macrófagos

Células cujas funções principais são identificar, ingerir e destruir microrganismos são fagócitos, representados pelos neutrófilos e macrófagos (Abbas *et al.*, 2010). A atuação desses fagócitos segue sequencialmente os passos de recrutamento ativo de células ao sítio de infecção, reconhecimento dos microrganismos, ingestão dos mesmos por fagocitose, e destruição dos micróbios ingeridos (Abbas *et al.*, 2010). Além disso, os fagócitos produzem citocinas que são fundamentais tanto para ambos os sistemas imune inato e adaptativo (Abbas *et al.*, 2010).

Neutrófilos, conhecidos também como leucócitos polimorfonucleares por possuírem núcleo segmentado em 3 a 5 lóbulos, são os responsáveis por promover a resposta inflamatória mais precoce (Abbas *et al.*, 2010). Possuem dois tipos de grânulos citoplasmáticos: os chamados grânulos específicos, contendo lisozimas, elastases e collagenases, enzimas proteases com função antimicrobiana; e os grânulos azurofílicos, que são lisossomos contendo enzimas e outras substâncias microbicidas como defensinas e catelicidinas.

Macrófago é a forma ativada de fagócitos mononucleares que desempenham papel fundamental nas imunidades inata e adquirida (Abbas *et al.*, 2010). Os fagócitos mononucleares formados na medula óssea ganham a circulação na forma de monócitos e chegam aos tecidos onde maturam e tornam-se macrófagos, que podem assumir diversas formas distintas após ativação por estímulos externos, como micróbios (Abbas *et al.*, 2010). A resposta inflamatória dos macrófagos é praticamente tão rápida quanto a dos neutrófilos, mas sobrevivem muito mais tempo no sítio inflamatório (Abbas *et al.*, 2010).

Além disso, os macrófagos não são células completamente diferenciadas como os neutrófilos, podendo, assim, passar por processos de multiplicação celular no local de inflamação, o que os torna o tipo celular mais abundante dos estágios tardios da resposta imune inata (tipicamente 1 ou 2 dias) (Abbas *et al.*, 2010).

Macrófagos e neutrófilos são ativados a destruir os microrganismos fagocitados por estímulo a seus vários tipos de receptores que identificam patógenos, como os TLRs, receptores da proteína C3 e receptores de citocinas (Abbas *et al.*, 2010). Tais receptores atuam cooperativamente para induzir a fusão do vacúolo fagocítico (fagossomo) com lisossomos, que contém enzimas antimicrobianas, formando o fagolisossomo, onde se dá o processo de destruição dos microrganismos fagocitados (Abbas *et al.*, 2010). Neutrófilos produzem elastase no fagolisossomo, uma serina protease de amplo espectro, e catepsina G, ambas sabidamente bactericidas (Abbas *et al.*, 2010). Macrófagos, e também neutrófilos, convertem oxigênio molecular em espécies reativas a oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), através do sistema enzimático oxidase do fagócito (Abbas *et al.*, 2010). ROS são agentes de alto poder oxidativo, capazes de destruir micróbios e também células do próprio organismo (Dzik, 2010). Estímulos de TLRs e IFN- γ , entre outros, ativam o sistema oxidase que então reduz oxigênio a ROS, como os radicais superóxidos, utilizando nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como cofator (Dzik, 2010). Superóxido gera peróxido de hidrogênio, que é usado pela enzima mieloperoxidase para converter íons hálidos (ânions de flúor, iodo, bromo e cloro), normalmente não-reativos, em ácidos hipohálidos altamente tóxicos para a bactéria, e células em geral (Abbas *et al.*, 2010). Além da formação de ROS tóxicos, o sistema enzimático oxidase também é responsável por criar um ambiente pH e osmolaridade elevados no interior dos vacúolos fagocíticos, condição necessária para a atividade de elastase e catepsina G (Abbas *et al.*, 2010). Macrófagos produzem ainda intermediários reativos ao nitrogênio, principalmente óxido nítrico (NO) por ação da enzima citoplasmática óxido nítrico sintase indutível (iNOS, do inglês *inducible nitric oxide syntase*) (Dzik, 2010). iNOS pode ser altamente induzida por TLRs associados a patógenos, especialmente em combinação com IFN- γ , e catalisa a conversão de arginina a citrulina, liberando gás óxido nítrico livremente difundível (Abbas *et al.*, 2010). No interior do vacúolo fagocítico, o óxido nítrico pode se combinar com os superóxidos e peróxidos de hidrogênio, formando os radicais peroxinitritos altamente reativos que matam bactérias (Abbas *et al.*, 2010). Tanto ROS quanto óxido nítrico e seus produtos são incapazes de distinguir entre tecidos próprios e microrganismo e, uma vez lançados no meio extracelular, são capazes de causar dano tecidual (Abbas *et al.*, 2010). Macrófagos ainda

desempenham papel através de citocinas produzidas por eles. Além de TNF, interleucina 1 e quimiocinas envolvidas na indução da resposta inflamatória, os macrófagos ainda secretam interleucina 12, que estimula células NK e linfócitos T a produzirem IFN- γ (Abbas *et al.*, 2010). Exemplos de citocinas e suas funções serão discutidos mais adiante.

2.4.2.4 Células dendríticas

Células dendríticas são vastamente distribuídas pelos tecidos linfoides, epitélio das mucosas, e parênquima de órgãos, desempenham papéis importantes na resposta imune inata e é um elo entre esta e a resposta imune adaptativa (Abbas *et al.*, 2010). Possuem receptores de reconhecimento de padrões, os PRRs, responsáveis por reconhecer PAMPs, e secretam citocinas, como interferon, em resposta a micróbios (Abbas *et al.*, 2010). Células dendríticas constituem a principal célula apresentadora de antígenos, as APC, o que as torna um elo importante entre imunidade inata e adaptativa ao capturar e apresentar antígenos microbianos a linfócitos T (Abbas *et al.*, 2010). As células dendríticas estão normalmente em estado inativo, ou imaturo, e nesse estágio é capaz de capturar antígenos por endocitose e transportá-los aos tecidos linfoides (Abbas *et al.*, 2010). Nesse processo, a célula madura se torna extremamente eficiente na apresentação de antígenos a linfócitos T imaturos. Receptores de manose permitem que a célula capture e internalize antígenos microbianos enquanto receptores TLR da célula a induzem a secretar citocinas e a iniciar o processo de maturação (Abbas *et al.*, 2010). Células dendríticas maduras perdem a capacidade de adesão ao epitélio e passam a expressar o receptor de quimiocinas CCR7, um receptor específico para quimiocinas produzidas na região T-dependente dos tecidos linfoides e que também é expresso em linfócitos T (Abbas *et al.*, 2010). Esse receptor é o responsável pela migração dos linfócitos T para essas zonas T-dependentes dos órgãos linfoides, conduzindo de forma orquestrada as células dendríticas portando antígeno para a zona de alta concentração de linfócitos imaturos (Abbas *et al.*, 2010). Células dendríticas podem ingerir células infectadas por patógenos intracelulares e apresentar antígenos dessas células para linfócitos T CD8⁺ por meio de apresentação via MHC classe I (Abbas *et al.*, 2010). Essa forma de apresentação de antígenos pela célula dendrítica é conhecida como apresentação cruzada por seguir o caminho contrário ao caminho usual no qual antígenos ingeridos em vesículas são apresentados via MHC classe II, enquanto proteínas citoplasmáticas são apresentados por intermédio de MHC classe I. O mecanismo de apresentação cruzada, então, faz referência a uma célula (dendrítica) pode apresentar antígenos de outro tipo celular (célula infectada), via MHC classe I, e ativar linfócitos T específicos para esse antígeno.

Células dendríticas apresentam seus antígenos também aos linfócitos T CD4⁺ linfócitos B, fazendo assim o elo entre imunidade inata e os sistemas imune adaptativo celular e humoral (Abbas *et al.*, 2010).

2.4.2.5 Linfócitos T $\gamma\delta$ -TCR⁺ e B-1

Embora a grande maioria de linfócitos T e B pertençam ao sistema imune adaptativo e apresentam uma vasta gama de repertório de especificidade a diferentes antígenos, alguns deles – especificamente os linfócitos intra-epiteliais T de receptor $\gamma\delta$ e os linfócitos B-1 –, apresentam baixa variedade e reconhecem estruturas comuns a classes de patógenos, ou seja, reconhecem PAMPs, pertencendo assim ao sistema imune inato (Abbas *et al.*, 2010). Os linfócitos T são diferenciados pelos tipos de receptores de antígenos de células T (TCR, do inglês *T cell antigen receptor*), sendo que a maioria das células T apresenta o receptor $\alpha\beta$ e reconhecem especificamente uma ampla diversidade de antígenos. Linfócitos T $\gamma\delta$ -TCR⁺, por sua vez, têm baixa diversidade a antígenos (Abbas *et al.*, 2010). Em contrapartida, esses linfócitos T $\gamma\delta$ -TCR⁺ são capazes de reconhecer estruturas não-peptídicas, diferentemente do linfócitos T $\alpha\beta$ -TCR⁺ (Abbas *et al.*, 2010). Os linfócitos intra-epiteliais do tipo $\gamma\delta$ -TCR⁺ podem atuar no sistema imune secretando citocinas, ativando fagócitos e diretamente destruindo células infectadas (Abbas *et al.*, 2010). Já os linfócitos B-1 apresentam os receptores comuns aos demais tipos de linfócitos B, as imunoglobulinas, mas estas apresentam baixa diversidade (Abbas *et al.*, 2010). Muitos dos linfócitos B-1 estão presentes nos intestinos e produzem anticorpos imunoglobulina M (IgM) específicos para polissacarídeos e lipídios comumente presentes em membranas bacterianas (Abbas *et al.*, 2010). Esses anticorpos são ditos anticorpos naturais, pois estão presentes mesmo em indivíduos sem sinais de infecção alguma, constituindo um sistema de defesa previamente formado para o caso de algum patógeno consiga ultrapassar a barreira epitelial (Abbas *et al.*, 2010).

2.4.2.6 Células *Natural Killer*

Células *natural killer* (NK) são alvos de muito estudo e especulação quanto a sua origem e papel na imunidade inata. Além de não necessitarem contato prévio com o antígeno (Abbas *et al.*, 2010), as células NK não são limitadas à apresentação de antígenos pelo MHC. As células NK são linfócitos mononucleares sem capacidade de memória, que não expressam receptores e moléculas de membrana característicos dos linfócitos T (TCR) (Dalloul e Lillehoj, 2006) nem de linfócitos B (as imunoglobulinas), sendo fenotipicamente caracterizadas como não-T, não-B e não-macrófagos (Lillehoj e Lillehoj, 2000; Abbas *et al.*, 2010) e possuem atividade citotóxica não específica, não

restrita por MHC (Kindt *et al.*, 2007). Células NK são capazes de reconhecer e distinguir células infectadas ou lesadas das células saudáveis, destruindo apenas as primeiras, poupando as células íntegras (Abbas *et al.*, 2010). O mecanismo para essa distinção é peculiar. Células NK apresentam diversas famílias de receptores na sua superfície. Tais receptores são complexos de subunidades sinalizadoras que transduzem sinais estimulatórios ou inibitórios da atividade de NK (Abbas *et al.*, 2010). O resultado de efetivamente eliminar ou não a célula-alvo é determinado pela integração de sinais inibitórios e estimulatórios entre os receptores de NK e suas interações com moléculas na célula-alvo (Abbas *et al.*, 2010). Muitos dos receptores de NK reconhecem moléculas de MHC classe I ou proteínas estruturalmente homólogas a MHC classe I (Kelley *et al.*, 2005). Como será visto mais adiante, MHC classe I apresenta peptídeos derivados de proteínas citoplasmáticas, incluindo antígenos microbianos, na superfície para reconhecimento pelos Linfócitos T CD8⁺ (linfócitos T citotóxicos) (Abbas *et al.*, 2010). O reconhecimento tanto de MHC classe I quanto de proteínas semelhantes a MHC classe I é fundamental para que a célula NK seja capaz de distinguir entre células infectadas e células saudáveis (Krueger *et al.*, 2011). Grande parte dos receptores de proteínas semelhantes a MHC classe I atuam de maneira estimulatória para a atividade de NK, enquanto os receptores de MHC classe I atuam inibindo-a (Abbas *et al.*, 2010). MHC de classe I é constitutivamente expresso em praticamente todas as células saudáveis do organismo. Já as proteínas semelhantes a MHC classe I são geralmente expressas somente em células infectadas e em células tumorais (Abbas *et al.*, 2010). Ainda, MHC classe I costuma ter expressão reduzida em células infectadas e tumorais (Abbas *et al.*, 2010). Logo, ao encontrar uma célula saudável, NK interage com MHC classe I expresso normalmente, e os sinais inibitórios são transduzidos efetivamente para a célula NK, impedindo a indução de morte celular (apoptose) na célula-alvo (Abbas *et al.*, 2010). O desbalanço entre o menor número de MHC classe I e maior número de proteínas semelhantes a MHC classe I expressas em uma célula infectada faz com que os sinais estimulatórios superem a sinalização de inibição e a célula NK ative os mecanismos de indução apoptótica (Abbas *et al.*, 2010; Krueger *et al.*, 2011). A transdução de sinais dos receptores estimulatórios e inibitórios neutralizam uma a outra. A transdução estimulatória ocorre por meio de uma cascata de enzimas quinases, promovendo a fosforilação das proteínas da rota. Já o caminho inibitório atua por intermédio de fosfatases, grupo de enzimas que catalisam a remoção de grupamentos fosfatos, contra-atacando a cascata dependentes de quinases desencadeada pelos receptores estimulatórios (Abbas *et al.*, 2010). Esse mecanismo de atacar células apresentando redução de MHC classe I torna

as células NK extremamente importantes no combate a infecções, permitindo ao sistema imune inato eliminar patógenos que induzam a redução da expressão de MHC classe I para se tornar invisível aos linfócitos T (Abbas *et al.*, 2010).

As células NK produzem citocinas capazes de modular ambas as respostas imunes inata e adquirida (Kindt *et al.*, 2007). A produção de interferon gama (IFN- γ) pelas NK é capaz de afetar a participação de macrófagos na imunidade inata através da ativação das atividades fagocíticas e microbidas, além de inibir a expansão de Th₂ e estimular a diferenciação de linfócitos T em Th₁ por induzir a síntese de IL-12 por macrófagos e células dendríticas (Kindt *et al.*, 2007), aumentando a resposta celular. IL-12 é ainda um potente indutor de produção de IFN- γ pela célula NK e também estimula a sua atividade citotóxica, enquanto IL-15 é um potente fator de crescimento para células NK (Abbas *et al.*, 2010).

A produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), além de IFN- γ , é capaz de promover resistência celular e instruir a resposta imune adaptativa (Bryceson e Long, 2008). As células NK intestinais aumentam na galinha em resposta a infecções primárias e secundárias por *Eimeria* spp. (Lillehoj e Lillehoj, 2000). Os IELs contêm uma subpopulação de NK que participam no controle da coccidiose, talvez pela citotoxicidade a células infectadas ou como fontes de interferon gama (IFN- γ) (Lillehoj e Lillehoj, 2000). O mecanismo de morte celular promovido pelas células NK é semelhante ao utilizado por linfócitos T citotóxicos (Kindt *et al.*, 2007; Abbas *et al.*, 2010). O citoplasma de NK é repleto de numerosos grânulos contendo perforinas e granzimas. No entanto, ao contrário dos linfócitos T citotóxicos, células NK não precisam de ativação para que seus grânulos apareçam (Abbas *et al.*, 2010). Elas são construtivamente citotóxicas, sempre apresentando grânulos no citoplasma. Após adesão das células NK à célula-alvo e correta distinção entre célula infectada e sadia, ocorre liberação das perforinas, granzimas e proteínas semelhantes a saposinas (SAPLIP) (Jacobs *et al.*, 2003; Abbas *et al.*, 2010). As perforinas formam um poro na membrana da célula alvo (Abbas *et al.*, 2010), facilitando a entrada de granzimas e SAPLIP, induzindo a apoptose (Jacobs *et al.*, 2003; Fan e Zhang, 2005). NK-lisina é uma proteína SAPLIP com ampla atividade antimicrobiana contra diversos patógenos como vírus, bactérias intracelulares e *Eimeria maxima* e *acervulina* (Hong *et al.*, 2006a). NK-lisina tem a característica de ser uma molécula efetora de linfócitos T e auxilia fortemente a morte celular programada mediada por perforinas e granzimas (Fan e Zhang, 2005). NK-lisina em altas concentrações promove morte celular imediata, e em concentrações mais baixas atrai quimicamente as células imunes, sendo

um potente ativador dessas células (Fan e Zhang, 2005).

2.4.3 Citocinas e quimiocinas

A comunicação entre células inflamatórias do sistema imune e entre essas células e os tecidos responsivos é feita principalmente por intermédio das citocinas (Gabay e McInnes, 2009), cujo nome deriva do grego *cyto* (célula) e *kynos* (movimento). As principais fontes de citocinas no sistema imune inato são macrófagos, neutrófilos e células NK (Abbas *et al.*, 2010). Citocinas são proteínas secretadas por células de ambos os sistemas imune inato e adaptativo em resposta a microrganismos e outros antígenos, mediando muitas das funções das células imunes (Zekarias *et al.*, 2002). A nomenclatura original das citocinas se baseou na sua célula-fonte: monocinas, em referência a citocinas produzidas por fagócitos mononucleares, e linfocinas quando produzidas pelos linfócitos (Abbas *et al.*, 2010). Mais tarde, ao se perceber que as mesmas citocinas eram produzidas por uma variedade de células, preferiu-se adotar o termo genérico “citocina” para se referir a esse tipo de molécula (Abbas *et al.*, 2010). Devido ao fato de muitas citocinas serem produzidas por leucócitos (como macrófagos e células T) e atuam em outros leucócitos, as citocinas costumam também serem denominada interleucinas (IL) referente a atuação *entre* leucócitos (Abbas *et al.*, 2010). Este último termo, embora errônea – há muitas citocinas que são de origem leucocitária e possuem ação apenas em leucócitos e não são chamadas interleucinas, enquanto outras citocinas denominadas interleucinas são produzidas por, ou agem em, células não leucocitárias –, tem sido útil ao se atribuir números às novas interleucinas (IL-1, IL-2, etc.) à medida que vêm sendo descobertas (Abbas *et al.*, 2010), tornando a nomenclatura padronizada.

As citocinas são polipeptídeos produzidos em resposta a antígenos, mediando e regulando as reações imune e inflamatória. Citocinas em geral não são estocadas na célula com moléculas pré-formadas, sendo a sua síntese iniciada com nova transcrição gênica resultante da ativação celular (Abbas *et al.*, 2010). A ativação transcricional é transiente e o RNA mensageiro das citocinas é geralmente instável, logo, a síntese de citocinas é também transiente (Abbas *et al.*, 2010). Uma vez sintetizada, a secreção das citocinas é um evento súbito. O modo de ação das citocinas é muitas vezes pleiotrópico (uma citocina age em mais de um tipo celular) e redundante (a mesma função é desempenhada por diferentes citocinas), o que permite às citocinas atuarem em diversos processos biológicos e que a falta de uma citocina possa ser compensada pela ação de outras citocinas (Abbas *et al.*, 2010). Outra característica da ação de citocinas é que frequentemente uma influencia a síntese e ação de outra. Tal característica leva à

formação de cascatas de modo a uma citocina mediar os efeitos biológicos de outra, potencializar sinergicamente o efeito ou ainda antagonizar a ação de uma citocina (Abbas *et al.*, 2010) e seus efeitos podem ser locais ou sistêmicos. As citocinas ligam-se com alta afinidade a seus receptores e sinais externos, como a estimulação de linfócitos T ou B por antígenos leva ao aumento da expressão desses receptores. Este é um dos mecanismos capazes de manter a resposta imune específica mesmo quando as citocinas em si são inespecíficas (Abbas *et al.*, 2010). A resposta celular ao estímulo provocado pelas citocinas é altamente regulada e consiste geralmente em mudanças na expressão de genes na célula-alvo (Ovington *et al.*, 1995), levando muitas vezes à diferenciação de linfócitos T e B e ativação de células efectoras, como macrófagos (Abbas *et al.*, 2010), ocorrendo também retroalimentação inibitória. Duas exceções a essa regra de atuação por mudanças na expressão gênica é o fator de necrose tumoral, que pode induzir apoptose por ativação enzimática (Dinarello, 2002), e a classe de citocinas denominadas quimiocinas (Abbas *et al.*, 2010). Quimiocinas são citocinas que estimulam a atração de linfócitos T e B ao sítio de inflamação por provocar reorganização rápida no citoesqueleto e altera a afinidade das integrinas, responsável pela desaceleração e adesão dos leucócitos no endotélio, o que permite a sua migração ao local de infecção (Abbas *et al.*, 2010).

Todos os receptores de citocinas consistem em uma ou mais proteínas transmembrana, sendo a porção extracelular responsável pela ligação à citocina e a porção citoplasmática responsável por iniciar a transdução de sinais intracelular (Abbas *et al.*, 2010). A classificação dos receptores de citocina é geralmente feita com base na homologia estrutural dos domínios extracelulares de ligação à citocina e pelo compartilhamento de mecanismos de sinalização intracelular (Abbas *et al.*, 2010). Nesse sistema de classificação, tais receptores podem ser agrupados em cinco famílias, descritas a seguir.

Receptores de citocina tipo I, também chamados receptores de hemopoietina, contém uma ou mais cópias de um domínio contendo um par de cisteínas e uma sequência próxima a membrana de triptofano-serina-X-serina-triptofano (WSXSW, usando a nomenclatura de letras para definir aminoácidos), sendo “X” um aminoácido qualquer. Esses receptores ligam-se tipicamente a citocinas capazes de se dobrar em quatro α -hélices, denominadas citocinas do tipo I (Abbas *et al.*, 2010). Enquanto esse domínio é responsável pela ligação à citocina, outros resíduos de aminoácidos é responsável pela especificidade (Abbas *et al.*, 2010). Todos receptores do tipo I atuam através de uma rota

de sinalização na qual a ligação de citocina ao receptor ativa uma tirosina quinase, denominada Janus quinase (Jak, do inglês *Janus kinase*) e leva a ativação de fatores de transcrição conhecidos como transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT, do inglês *signal transducers and activators of transcription*) que induz transcrição gênica (Abbas *et al.*, 2010). Esse mecanismo de sinalização é conhecido como Jak-STAT, devido aos eventos de sinalização resumidos acima. Diversas citocinas atuam por meio do receptor tipo I e podem ativar diferentes conjuntos de Jaks e STATs (Abbas *et al.*, 2010). Os receptores de citocina do tipo II são similares às do tipo I, também ativam o sistema Jak-STAT mas contém dois pares de cisteínas extracelulares e não apresentam o domínio WSXSW (Abbas *et al.*, 2010).

Os receptores da família de interleucina I apresentam um receptor de IL-1 semelhante a Toll (TIR, do inglês *Toll-like/IL-1 receptor*) e também induzem expressão gênica (Abbas *et al.*, 2010), mas por meio de uma família de quinases associadas ao receptor de IL-1 (IRAK, do inglês, *IL-1 receptor associated kinase*) (Suzuki *et al.*, 2002).

Receptores do fator de necrose tumoral (TNF) apresentam um domínio trimérico conservado rico em cisteína e o mecanismo de sinalização intracelular envolve indução de apoptose e/ou estímulo de expressão gênica (Abbas *et al.*, 2010).

Os receptores de quimiocinas promovem respostas rápidas a quimiocinas e a diferentes mediadores inflamatórios. Devido ao seu domínio transmembrana atravessar completamente a membrana por 7 vezes e por seu mecanismo de sinalização intracelular ser via proteínas ligantes a guanosina trifosfato (GTP), a proteína G, esses receptores podem também chamados de “receptores serpentina” (Abbas *et al.*, 2010) ou receptores com sete domínios α -helicoidais transmembrana, ou simplesmente, receptores acoplados à proteína G (Murphy *et al.*, 2008; Abbas *et al.*, 2010).

As citocinas podem ser agrupadas funcionalmente de acordo com suas principais atuações biológicas: (a) mediadores e reguladores da imunidade inata; (b) mediadores e reguladores da imunidade adquirida; e (c) estimuladores da hematopoiese.

As citocinas mediadoras e reguladoras da imunidade inata são componentes fundamentais nos estágios iniciais da resposta imune (Abbas *et al.*, 2010) e incluem o fator de necrose tumoral (TNF), as quimiocinas, os interferons (IFN) tipo I (IFN- α e IFN- β) e as interleucinas 1, 6, 10, 12, 15, 18, 23 e 27 (Abbas *et al.*, 2010).

O fator de necrose tumoral é sintetizado basicamente por fagócitos ativados, mastócitos, células NK e alguns linfócitos T ativados (Shu *et al.*, 1996). Tem como

principal função estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos ao sítio de infecção e ativá-los por estimular células endoteliais e leucócitos, como macrófagos a sintetizaram quimiocinas (Abbas *et al.*, 2010). TNF estimula a atividade microbicida de neutrófilos e macrófagos e, neste último, TNF ainda estimula a produção de IL-1, que compartilha muitas das funções biológicas do TNF (Abbas *et al.*, 2010). A porção extracelular do TNF inicia uma série de respostas celulares, notadamente a ativação do fator de transcrição pró inflamatório NF- κ B (Shu *et al.*, 1996).

Quimiocinas, uma contração de “citocinas quimiotáticas”, podem ser consideradas como sendo citocinas mediadoras do movimento de leucócitos e regulam sua migração da circulação sanguínea para os tecidos (Mukaida e Baba, 2012). Podem ter sua expressão induzida em diversos tipos celulares em resposta a inflamação, como por estímulo de TNF e IL-1, ou ser constitutivamente expressas em alguns tecidos, recrutando linfócitos na ausência de inflamação (Abbas *et al.*, 2010). Os receptores de quimiocinas são acoplados à proteína G (Moser *et al.*, 2004), catalisando a troca de guanosina difosfato (GDP) por GTP (Moser *et al.*, 2004). O GTP associado a esses receptores ativa uma cascata enzimática responsável por alterações no citoesqueleto e na afinidade de integrinas, responsável pela migração de leucócitos (Abbas *et al.*, 2010).

Interleucina 1 é produzida principalmente por fagócitos ativados por antígenos microbianos e estimulada por outras citocinas, como TNF, mas pode ser sintetizada por outras células, como neutrófilos, células epiteliais e endoteliais (Abbas *et al.*, 2010). As duas formas biologicamente ativas de IL-1, IL-1 α e IL-1 β (Mulero *et al.*, 1999), ligam-se aos mesmos receptores, têm a mesma função biológica, e são ambas inibidas pelo terceiro membro da família IL-1, o receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra) (Staeheli (Staeheli *et al.*, 2001). Tanto IL-1 α e IL-1 β são produzidas como precursores maiores de 31 kD (Barksby *et al.*, 2007) e secretadas na forma madura de 17 kD (Smith *et al.*, 2000). Enquanto, IL-1 α é funcionalmente ativa mesmo na forma imatura, IL-1 β necessita ser clivada à forma madura para poder mostrar atividade (Barksby *et al.*, 2007). IL-1 atua através de seu receptor, que está envolvido na transdução de sinais que culminam na ativação do fator de transcrição NF- κ B (Barksby *et al.*, 2007). Uma vez ligada a IL-1, o receptor inicia o recrutamento da proteína MyD88, duas proteínas quinases (IRAK e IRAK-4), além de uma proteína adaptadora associada ao receptor de TNF (TRAF-6, do inglês *TNF receptor associated factor*). Após sucessivas reações de fosforilação, NF- κ B é ativado (Abbas *et al.*, 2010). Assim como TNF, IL-1 é mediadora de inflamação local e

estimula células endoteliais a aumentar a expressão moléculas de adesão a leucócitos, como integrinas, favorecendo o seu recrutamento (Abbas *et al.*, 2010). Em altas quantidades, IL-1 ganha a circulação sanguínea e causa efeitos endócrinos, como proliferação de neutrófilos e plaquetas na medula óssea, febre e indução da síntese de proteínas plasmáticas pelo fígado. Essas proteínas plasmáticas de origem hepática são igualmente induzidas por TNF e IL-6 e conhecidas como proteínas de fase aguda da inflamação (Abbas *et al.*, 2010). Embora IL-1 e TNF compartilhem os mesmos mecanismos de ação e indução dos mesmos fatores de transcrição e vias de sinalização, há algumas diferenças entre as duas citocinas. Primeiro, IL-1 é incapaz de causar apoptose e, segundo, mesmo em altas concentrações, IL-1 por si só não causa as mudanças fisiopatológicas do choque séptico, como TNF (Abbas *et al.*, 2010).

Interleucina 6 atua em ambas as imunidades inata e adaptativa (Staeheli *et al.*, 2001). O mecanismo de atuação dessa citocina se dá via receptores de citocina tipo I, ativando principalmente o sistema Jak-STAT. No sistema imune inato, IL-6 induz a síntese hepática de proteínas de fase aguda (Nibali *et al.*, 2011) e estimula a proliferação de neutrófilos (Abbas *et al.*, 2010). Na imunidade adaptativa age como fator de crescimento para linfócitos B, estimula a produção anticorpos e a diferenciação de linfócitos T (Nibali *et al.*, 2011).

Interleucina 10 é uma citocina reguladora da imunidade inata, particularmente por apresentar ação inibitória de macrófagos, e do ramo celular da resposta imune adaptativa por inibir a ativação de células T (Abbas *et al.*, 2010). Por ser principalmente produzida pelos próprios macrófagos cuja ação IL-10 inibe, esse é um excelente exemplo de regulador por retroalimentação negativa. IL-10 age por meios do seu receptor de citocina tipo II que se associa a quinases da família Janus e a Jak1, estimulando a sinalização via STAT3 (Abbas *et al.*, 2010). A atividade biológica de IL-10 na imunidade inata resulta da sua habilidade em inibir as funções exercidas por macrófagos ativados. Macrófagos exercem suas funções principalmente pela síntese de IFN- γ que é estimulado pela interleucina 12. IL-12, por sua vez, é o principal alvo de inibição por IL-10, o que passa a regular fortemente a atividade de macrófagos (Abbas *et al.*, 2010). IL-10 ainda atua na imunidade adquirida inibindo a expressão de MHC tipo II na superfície de macrófagos e células dendríticas, inibindo assim, a ativação de linfócitos T CD4⁺ (Abbas *et al.*, 2010).

A interleucina 12 é a principal mediadora da resposta imune inata inicial contra microrganismos intracelulares e é um indutor chave para o processo de imunidade mediada por células, a resposta imune adaptativa contra esses tipos de patógenos

(Abbas *et al.*, 2010). Sua função foi primeiramente descrita como a de ativar a citotoxicidade de células NK (Abbas *et al.*, 2010), porém sua atividade mais importante consiste em ativar a produção de IFN- γ por células T e NK (Krueger *et al.*, 2011). Juntamente com IFN- γ , IL-12 ainda promove a ativação de linfócitos T auxiliares CD4⁺ em linfócitos produtores de IFN- γ (T_H1) (Abbas *et al.*, 2010). A principal fonte de IL-12 são macrófagos e células dendríticas. Sua atuação se dá via receptores do tipo I, através da transdução via sistema Jak-STAT (Abbas *et al.*, 2010). O receptor de IL-12 possui duas cadeias, β -1 e β -2, que ligam-se a duas subunidades de IL-12: p40 (de 40 kD) e p35 (de 35 kD), respectivamente (Abbas *et al.*, 2010). IFN- γ , cuja síntese é estimulada por IL-12, é capaz de aumentar a expressão da cadeia β -2 do receptor de IL-12, amplificando a resposta imune (Abbas *et al.*, 2010). IL-12 estimula células T e NK a produzirem IFN- γ que então ativa macrófagos a digerir microrganismos fagocitados (Abbas *et al.*, 2010).

Interleucina 15 é um importante fator de crescimento de células T e NK, sendo talvez necessária para a sua ativação. Produzida por macrófagos em resposta a fatores que iniciam a resposta imune inata, IL-15 é um membro da família de citocinas tipo I, ativando Jak-STAT ativando sinais que promovem sobrevivência e proliferação celular (Abbas *et al.*, 2010).

Estruturalmente relacionada à IL-1, a interleucina 18 atua pela mesma via de IL-1, mas possui como principal função aumentar a produção de IFN- γ por linfócitos T e promover sua diferenciação em linfócitos T_H1 (Abbas *et al.*, 2010). Sua principal fonte inclui macrófagos e células dendríticas e sua produção é dependente de caspase-1 (Abbas *et al.*, 2010). A indução de IFN- γ por IL-18 em mamíferos é dependente de IL-12, o que não acontece em galinhas (Staeheli *et al.*, 2001).

As interleucinas 23 e 27 são relacionadas às IL-6 e 12, ambas atuando como ponte entre a imunidade inata e a resposta adaptativa (Abbas *et al.*, 2010). Agem sobretudo em células T e NK, promovendo a produção de IFN- γ , além da diferenciação de linfócitos T_H1 (Abbas *et al.*, 2010). IL-27 parece também desempenhar papéis regulatórios da atividade de células T, uma vez que camundongos deficientes dessa citocina apresentam uma inflamação letal mediada por linfócitos T (Abbas *et al.*, 2010).

Macrófagos e células dendríticas respondem à infecção secretando IL-12 que, por sua vez, induz a produção de IFN- γ por IL-18 em células NK e linfócitos T (Staeheli *et al.*,

2001), além de estimular a diferenciação de T_H1 (Abbas *et al.*, 2010). O recrutamento e ativação de leucócitos mediado por citocinas é responsável pela destruição de células infectadas, e a manifestação sistêmica da inflamação é fruto principalmente da secreção de TNF e IL-1 pelos macrófagos (Abbas *et al.*, 2010). Os IFNs tipo I (α e β) são secretados por macrófagos e células dendríticas infectadas e inibem a replicação de patógenos intracelulares, enquanto IL-15 ativa células NK (Ma *et al.*, 2011), que são estimuladas à citotoxicidade por IL-12. Células NK então destroem as células que serviriam de reservatório de infecções intracelulares (Abbas *et al.*, 2010).

2.4.4 Resposta imune adaptativa

O sistema imune inato é responsável pela primeira reposta de defesa do organismo contra agentes invasores e é composto por células que se comunicam entre si e com outras células por meio de citocinas. Muitas vezes a imunidade inata não é capaz por si só de sobrepujar uma infecção, sendo necessária a ação da imunidade adquirida, ou adaptativa.

Diversas citocinas estimulam a proliferação e diferenciação de linfócitos T, um componente da resposta imune adaptativa mediada por células. Outras citocinas ativam células efetoras especializadas do sistema imune. A primeira constitui a fase de ativação, enquanto a segunda pode ser classificada como a fase efetora da imunidade adaptativa (Abbas *et al.*, 2010).

De modo análogo à imunidade inata, a células responsáveis pela resposta adaptativa é grandemente mediada pela ação de citocinas (Kindt *et al.*, 2007), das quais as interleucinas 2, 4, 5, 13 e 17, o fator transformante de crescimento e o próprio IFN- γ são peças-chave no desenvolvimento da resposta imune adaptativa (Abbas *et al.*, 2010).

Interleucina 2 é estruturalmente homóloga à IL-15, sendo um importante fator de crescimento, sobrevivência e diferenciação de linfócitos T, sendo constitutivamente expressa nas células T regulatórias (Abbas *et al.*, 2010). A atuação de IL-2 se dá via receptores de citocina tipo I nas próprias células que a produz ou em células vizinhas, de modo autócrino ou parácrino, respectivamente. Linfócitos T $CD4^+$ produzem e secretam IL-2 em resposta a estímulo antigênico (Abbas *et al.*, 2010). Além de linfócitos T, IL-12 promove a proliferação e diferenciação de células NK e estimulam a produção de anticorpos pelos linfócitos B (Abbas *et al.*, 2010).

A interleucina 4 é oriunda principalmente de linfócitos T $CD4^+$ do tipo T_H2 e mastócitos ativados. Sua principal função biológica é servir de estímulo à produção de

imunoglobulina E (IgE) e promover o desenvolvimento de linfócitos T_H2 a partir de linfócitos T $CD4^+$ virgens (Abbas *et al.*, 2010). IL-4 atua tanto como citocina indutora de T_H2 como citocina efetora nessas células (Abbas *et al.*, 2010). Sua sinalização se dá pelo sistema Jak-STAT através de receptores de citocinas tipo I, envolvendo também uma rota que responde a insulina (IRS, do inglês, *insulin response substrate*). IL-4 também contribui, em conjunto com IL-13, para uma forma alternativa de ativação de macrófagos diferente da resposta por IFN- γ , induzindo a produção de colágeno e a expressão de receptores de manose, que promove a fagocitose dos microrganismos (Abbas *et al.*, 2010). A função estimulatória de IgE a torna uma citocina importante em reações alérgicas e em respostas a helmintos e artrópodes (Abbas *et al.*, 2010).

Interleucina 5 faz comunicação entre a ativação de linfócitos T e a resposta eosinofílica. É uma citocina do tipo I produzida por T_H2 $CD4^+$ e mastócitos ativados, cuja sinalização se dá por Jak-STAT (Abbas *et al.*, 2010). O estímulo ao crescimento e diferenciação de eosinófilos torna esta citocina importante no combate a parasitas como helmintos (Abbas *et al.*, 2010).

Interleucina 13 é estrutural e funcionalmente semelhante à interleucina 4, atuando de forma cooperativa a ela (Abbas *et al.*, 2010).

Interferon- γ é a principal ativadora de macrófagos e tem papel crucial na resposta imune inata e adaptativa a patógenos intracelulares (Abbas *et al.*, 2010). É chamado de IFN tipo II, e embora possua atividade antiviral, IFN- γ não é uma citocina antiviral potente, ao contrário dos IFNs tipo I. Sua função é principalmente de ativação de células efetoras. IFN- γ é produzida por células NK, T_H1 $CD4^+$ e linfócitos T $CD8^+$ (Abbas *et al.*, 2010), promove a diferenciação e linfócitos T $CD4^+$ virgens em linfócitos, promovem a indução de IgG em linfócitos B, que por sua vez ligam-se a receptores $Fc\gamma$ em fagócitos e ativam o complemento, ambos favorecendo a fagocitose de micróbios opsonizados. Assim, IFN- γ media a resposta por anticorpos que também participam da eliminação de patógenos mediada por fagócitos (Abbas *et al.*, 2010). IFN- γ estimula a expressão de moléculas MHC classe I e II e de co-estimuladores de células apresentadoras de antígenos, componentes do proteassomo e HLA-DM. Tais efeitos estimulam a apresentação de antígenos mediada por MHC e amplifica o reconhecimento pelo sistema imune por aumentar a expressão de ligantes reconhecidos por linfócitos T (Abbas *et al.*, 2010). O resultado é a efetiva promoção de uma resposta inflamatória rica em macrófagos.

A ação do fator transformante de crescimento β (TGF- β) no sistema imune pode ser tanto inibitório quanto estimulatório, dependendo do momento de sua atuação (Abbas *et al.*, 2010). Sua principal função imune é a de inibir a proliferação e ativação de linfócito e outros leucócitos. No entanto, TGF- β é capaz de estimular a produção de IgA por induzir a transformação de células B a esse isotipo de imunoglobulina (Abbas *et al.*, 2010). Sua função sobre a síntese de colágeno e em enzimas de manutenção da matriz celular de por macrófagos e fibroblastos exerce importante papel no reparo tecidual pós-inflamatório (Abbas *et al.*, 2010).

2.4.4.1 Resposta Celular

A imunidade mediada por células fornece o mecanismo de defesa contra patógenos capazes de sobreviver e replicar no interior de fagócitos e células não-fagocíticas (Abbas *et al.*, 2010). A resposta imune adaptativa tem sido classicamente dividida em humoral e celular. A primeira pode ser transferida de um doador imunizado a um receptor não imunizado através de anticorpos, na ausência de células. Já a resposta celular só pode ser transferida de um doador para um receptor através da transferência de linfócitos T viáveis. A imunidade humoral se inicia com o reconhecimento de antígenos por anticorpos secretados e se mostra efetiva contra microrganismos e toxinas extracelulares, ao passo de ter pouca eficácia frente a patógenos situados no interior das células (Abbas *et al.*, 2010). Contrastante a isso, a resposta imune celular se dá pelo reconhecimento de antígenos pelos linfócitos T, que são os efetores desse tipo de resposta. Os linfócitos T reconhecem peptídeos de microrganismos intracelulares que são exteriorizados por moléculas de MHC (Abbas *et al.*, 2010).

A resposta imune a microrganismos presentes no interior dos fagossomo dos fagócitos é mediada por linfócitos CD4⁺ efetores, conhecidos como T_H1 (Abbas *et al.*, 2010). Esses linfócitos reconhecem os antígenos microbianos e ativam os fagócitos a destruírem o patógeno. Como visto anteriormente, os fagócitos são a principal classe celular da resposta imune inata, porém, alguns microrganismos desenvolveram mecanismos que os habilitaram a sobreviver e até mesmo a replicar no interior de fagócitos, escapando da resposta imune inata (Abbas *et al.*, 2010). Nestas situações, a resposta imune adaptativa celular amplia a ação microbicida dos fagócitos, destruindo o patógeno. Assim, a especificidade da resposta imune celular é devida aos linfócitos T, porém a atividade efetora real, a eliminação do patógeno, é desempenhada pelos fagócitos (Abbas *et al.*, 2010). Esse cenário ilustra um importante elo entre as imunidades inata e adaptativa: por ação de citocinas, os linfócitos T estimulam a atividade de células

efetoras não específicas da imunidade inata (fagócitos), tornando-as agentes da imunidade adaptativa (Abbas *et al.*, 2010).

Alguns microrganismos infectam e replicam no interior de diversos tipos celulares, tanto não fagocíticas como fagócitos. A resposta imune celular a esse tipo de agente é mediada pelos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL, do inglês *cytotoxic T lymphocytes*), que matam a célula infectada eliminando o reservatório do microrganismo. Se a célula infectada não possui condições de eliminar o agente infeccioso, como é o caso de células não fagocíticas, a infecção só poderá ser erradicada por meio de CTLs (Abbas *et al.*, 2010).

Linfócitos T não reconhecem antígenos microbianos livres, dependendo de moléculas capazes de apresentar o antígeno aos linfócitos. Esse papel é desempenhado pelas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Essas moléculas possuem o papel fundamental de se ligar e apresentar peptídeos microbianos aos linfócitos T (Kaufman, 2008). Há duas formas clássicas de MHC: classe I e II. As moléculas de MHC classe I ligam-se a peptídeos derivados de proteínas encontradas no citoplasma, enquanto moléculas de MHC de classe II ligam-se a peptídeos oriundos de proteínas endocitadas do meio extracelular para o interior de vesículas intracelulares (Kaufman, 2008). Praticamente todas as células possuem MHC tipo I, que são reconhecidas por linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (Kaufman, 2008; Bishop *et al.*, 2011). Já as moléculas de classe II são encontradas apenas nas células apresentadoras de antígenos, e são reconhecidas pelos linfócitos CD4⁺ (Kaufman, 2008; Abbas *et al.*, 2010). O alto grau de polimorfismos encontrados no MHC é atribuído à co-evolução do hospedeiro com seus patógenos que, escapa do reconhecimento por células T ao mutar os peptídeos de identificados e ligados por MHC, selecionando aqueles indivíduos possuidores de novas moléculas de MHC capazes de identificar tal peptídeo mutado (Kaufman, 2008). Tal teoria é suportada pelo fato da maioria das alterações alélicas ocorrer na região de ligação a peptídeos do MHC (Kaufman, 2008).

O MHC de mamíferos compreende uma região ampla e complexa no genoma, com vários genes e pseudogenes (Kaufman, 2008) de classe I e II altamente expressos (Bishop *et al.*, 2011). As classes I e II são ainda separadas pela classe III (Kaufman, 2008; Bishop *et al.*, 2011) e apresentam genes codificantes de citocinas da família do fator de necrose tumoral, componentes da cascata do sistema complemento, genes envolvidos no carregamento de peptídeos ao MHC tipo I, como o proteassomo induzido por interferon (LMP), o transportador envolvido na apresentação de antígenos (TAP) e tapasina, uma

proteína associada à TAP (Kaufman, 2008).

O MHC da galinha foi originalmente identificado como o grupo B sanguíneo e amplamente associado a resistência a certos patógenos (Kaufman, 2008). O locus de MHC da galinha está localizado no cromossomo 16 (um microcromossomo) (Bloom e Bacon, 1985) e é formado por um “conjunto mínimo essencial” (Kaufman e Salomonsen, 1997) composto de genes de MHC classe I e IIB (Figura 3), denominados de classe B-F e B-L, respectivamente (Lamont, 1989) e ambos chamados conjuntamente de locus B (Kaufman, 1999). Nenhuma recombinação no locus BF/BL foi observada em nenhum cruzamento experimental (Kaufman, 2008). No mesmo microcromossomo, outro locus codifica MHC não clássico, o complexo fragmento de restrição padrão Y (Rfp-Y, do inglês *restriction fragment pattern Y*) (Thoraval *et al.*, 2003), também denominado MHC-Y (Kaufman *et al.*, 1999b; Delany *et al.*, 2009), foi identificado, porém está longe o suficiente para se segregar de modo independente do locus B (Delany *et al.*, 2009). Este locus contém ao menos um gene polimórfico codificando MHC tipo I não clássico e genes codificando MHC tipo II não clássicos (Kaufman, 2008) e receptores de células *natural killer* semelhantes a lectina, que podem estar associadas a forma como MHC pode direcionar a responsividade de células NK (Kaufman *et al.*, 1999a). O microcromossomo 16 de galinhas ainda contém uma região repetitiva de organização do nucléolo (NOR, do inglês *nucleolar organizing region*) responsável por direcionar a formação do nucléolo e o sítio de transcrição e síntese de RNAs ribossomais (Delany *et al.*, 2009).

Worley *et al.* (2010) avaliaram aves da eclosão até os 250 dias, por volta do início da maturidade sexual. Nesse tempo, 80% dos animais morreram devido a um surto de coccidiose. Animais heterozigotos para MHC sobreviveram mais tempo do que animais homozigotos, independentemente da heterozigosidade média em nível de genoma. Os autores evidenciaram associação entre um dos haplótipos (CD_c) com maior mortalidade a coccidiose. Esse haplótipo se comporta de modo recessivo, uma vez que homozigotos para CD_c apresentaram menor sobrevivência do que qualquer outro genótipo e heterozigotos portadores de CD_c apresentaram sobrevivência semelhante ao genótipo homozigoto mais resistente (Worley *et al.*, 2010).

Diversos trabalhos têm associado haplótipos de MHC a diferenças de resistência/susceptibilidade a infecções virais (Lakshmanan *et al.*, 1997; Boonyanuwat *et al.*, 2006; Goto *et al.*, 2009; Hunt *et al.*, 2010), bacterianas (Wigley, 2004; Lavi *et al.*, 2005) e parasitárias como coccidiose (Pinard-Van Der Laan *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2008a; Kim *et al.*, 2008b)

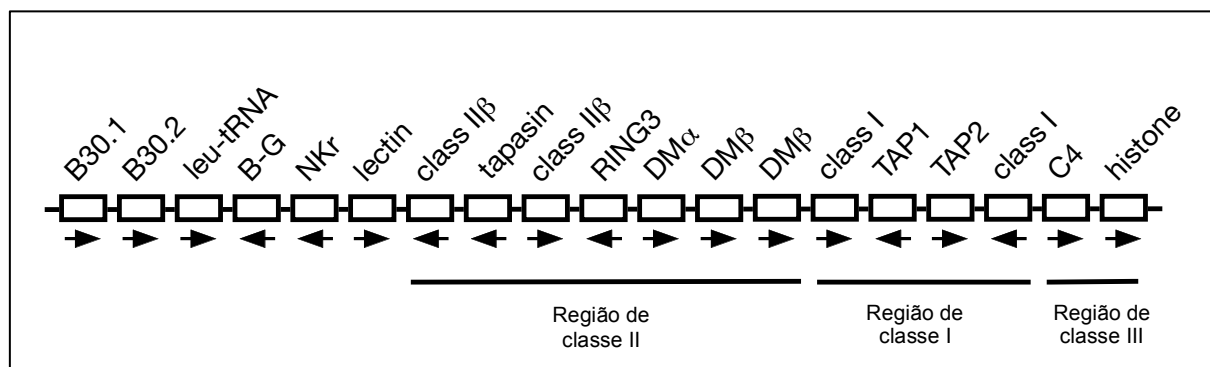


Figura 3. Genes da região B-F/B-L do MHC de galinha. Setas indicam orientação de transcrição. Anotação completa no GenBank: AL023516. (Kaufman *et al.*, 1999).

No entanto, nenhum genótipo MHC mostrou consistência no aumento da resistência a coccidiose (Medarova *et al.*, 2003). Aves com mesmos haplótipos de MHC, mas diferindo no restante do genoma, mostraram variação de resistência a coccidiose, indicando que genes não-MHC podem influenciar a resposta a infecção por *E. tenella* (Lillehoj *et al.*, 1989), uma vez que a resistência genética a doenças é uma característica poligênica (Lamont, 1998).

2.4.5 Imunidade à coccidiose

2.4.5.1 Relação hospedeiro-parasita

Os oocistos eliminados com as fezes das galinhas são imaturos (não esporulados, ocorrendo a esporulação no meio ambiente. Os oocistos diplóides sofrem esporogonia (meiose), resultando em quatro esporocistos. Em cada esporocisto, dois esporozoítos são formados. Os oocistos esporulados são infectantes através de seus esporozoítos.

As fases infectantes do gênero *Eimeria* – os esporozoítos e merozoítos –, possuem micronemas, rhoptrias e grânulos densos (Figura 4), organelas que são atribuídas ao processo de invasão da célula hospedeira por estarem presentes apenas nessas fases (Dubremetz *et al.*, 1998; Min *et al.*, 2004). As proteínas liberadas pelos micronemas participam do reconhecimento da célula hospedeira, da ligação a essa célula, da motilidade do parasita e da invasão da célula hospedeira (Dubremetz *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 2000; Bumstead e Tomley, 2000; Min *et al.*, 2004). As proteínas liberadas pelas rhoptrias e pelos grânulos densos participam da formação do vacúolo parasitóforo e da sua ativação como um compartimento metabolicamente ativo (Dubremetz *et al.*, 1998; Min *et al.*, 2004). As Rhoptrias secretam o seu conteúdo durante a internalização do parasita na célula hospedeira e as suas proteínas são encontradas na membrana do vacúolo

parasitóforo (Dubremetz *et al.*, 1998). As proteínas secretadas pelos grânulos densos podem também ser secretadas dentro do vacúolo parasitóforo após a internalização do parasita (Dubremetz *et al.*, 1998; Min *et al.*, 2004). Em consequência da associação dessas organelas com a invasão das células hospedeiras, as suas proteínas podem ser alvos de tratamento medicamentoso ou de resposta imune. Por isso elas têm recebido atenção da pesquisa não só no gênero *Eimeria*, como em outros A picomplexa como *Plasmodium*, *Babesia*, *Sarcocystis*, *Toxoplasma*, entre outros (Kaasch e Joiner, 2000).

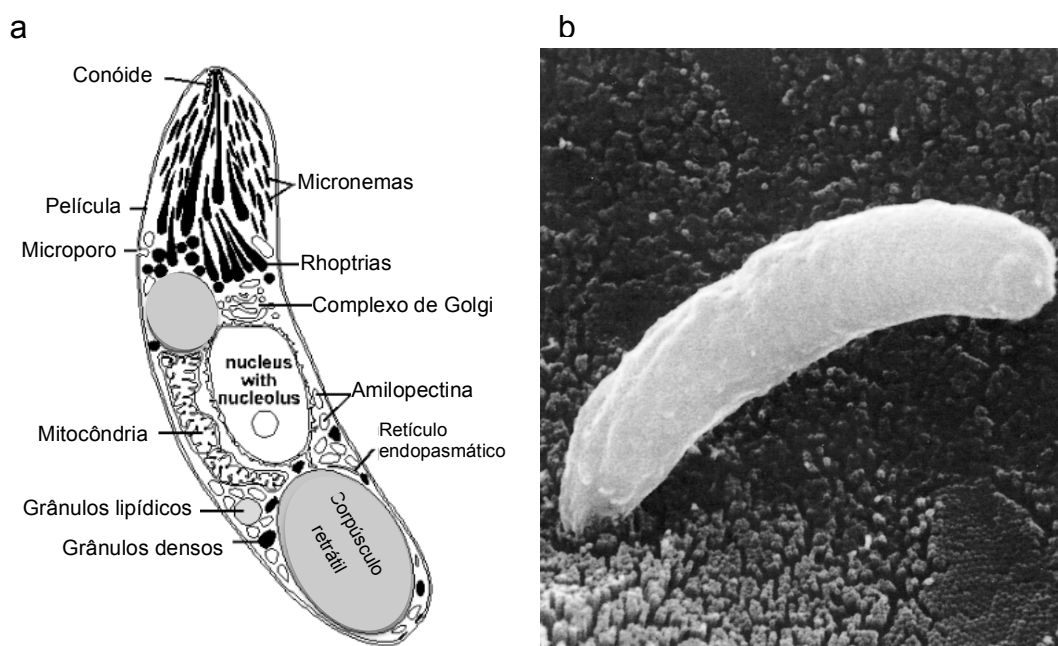


Figura 4. Esporozoíto de *Eimeria tenella*. (a) estruturas associadas à penetração na célula (<http://www.saxonet.de/coccidia/et-spz.htm>, acesso em 14.10.2011). (b) micrografia eletrônica de varredura do momento de invasão do esporozoíto de *E. tenella* (Institute for Animal Health <http://www.iah.ac.uk/CIDLID/A649.aspx>, acesso em 14.10.2011)

Durante a migração dos esporozoítos através da lâmina própria (Figura 2), alguns são vistos no interior de leucócitos como linfócitos B, macrófagos e linfócitos T, especialmente os CD8⁺, mas a maioria migra ativamente pela lâmina própria (Vervelde *et al.*, 1995). A maioria dos esporozoítos vistos no interior de linfócitos durante a sua migração até as criptas, se encontram em células CD8⁺ (15%) ou CD3⁺ (13-22%) (Beattie *et al.*, 2001a). A migração dos esporozoítos pela lâmina própria é retardada ou inibida em aves imunes (Riley e Fernando, 1988; Vervelde *et al.*, 1995). Em aves imunizadas e desafiadas com cepa homóloga de *E. maxima*, os esporozoítos se acumulam na lâmina própria não migrando até as criptas, onde apenas 5% são encontrados às 72 horas pós-inoculação (Beattie *et al.*, 2001b).

2.4.5.2 Imunidade inata e adaptativa à coccidiose

O sistema imune das mucosas é composto de tecidos linfoides associados à mucosa (MALT), principalmente no trato respiratório e nos intestinos (Lillehoj e Lillehoj, 2000). Desses, os tecidos linfoides associados ao intestino (GALT) formam o componente principal. Os GALT formam a primeira linha de defesa contra infecção por *Eimeria* (Lillehoj e Lillehoj, 2000). Os componentes não-específicos como secreções gástricas, peristaltismo e exclusão competitiva, e específicos como linfócitos e anticorpos, dos GALT, formam barreiras contra patógenos entéricos como as *Eimeria* (Lillehoj e Lillehoj, 2000).

Os linfócitos intra-epiteliais do intestino (IELs) se constituem de linfócitos do tipo B (10%) e do tipo T (90%) (Lillehoj e Lillehoj, 2000). Os linfócitos da lâmina própria são predominantemente linfócitos T ativados (Lillehoj e Lillehoj, 2000), divididos em populações de CD4⁺ e de CD8⁺. Linfócitos CD4⁺ atuam como T auxiliares (T_H1 = imunidade celular e T_H2 = imunidade por anticorpos) e os CD8⁺ atuam como linfócitos T citotóxicos/supressores (Tc/s) (Breed *et al.*, 1996; Mcdonald, 1999). O linfócitos T_H1, bem como os linfócitos citotóxicos CD8⁺ estão associados a solucionar infecções por patógenos intracelulares enquanto linfócitos T_H2 resolvem complicações por patógenos extracelulares (Cornelissen *et al.*, 2009). Os receptores CD4⁺ e CD8⁺ colaboram com o receptor da célula T (TCR) no reconhecimento da molécula do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) associada a um antígeno apresentado pelas células APC (Breed *et al.*, 1996). Por definição, as células CD4⁺ reconhecem antígenos apresentados por moléculas de MHC de classe II que estão presentes em macrófagos e outras células do sistema imune, enquanto as células CD8⁺ reconhecem antígenos apresentados por moléculas de MHC de classe I, presentes em todas as células do hospedeiro (Kindt *et al.*, 2007). As células T de galinhas possuem três tipos de receptores: o TCR1, o TCR2 e o TCR3, sendo o TCR1 homólogo ao $\gamma\delta$ TCR dos mamíferos e os TCR2 e 3 homólogos ao $\alpha\beta$ TCR (Breed *et al.*, 1996). Os linfócitos T $\gamma\delta$ TCR⁺, em mamíferos, são células CD4⁻ e CD8⁻ (Choi e Lillehoj, 2000).

O número de células CD4⁺ são reduzidos aos 9-10 dias pós infecção primária por *E. tenella* (Breed *et al.*, 1996). Aves tratadas com anticorpos anti-CD4 produzem mais oocistos quando submetidas a infecção primária por *E. tenella*, mas a imunidade adquirida frente a infecção secundária não é afetada por esse tratamento (Trout e Lillehoj, 1996). Tanto após infecções primárias como secundárias por *E. acervulina*, aves resistentes à coccidiose apresentam uma resposta local em células CD4⁺ mais rápida (4 dias pós-

infecção, dpi) que aves sensíveis a coccidiose (6 - 8 dpi) (Choi *et al.*, 1999b). Essa resposta rápida na proliferação de linfócitos CD4⁺ pode estar associada à habilidade das aves resistentes controlarem a infecção por *E. acervulina* (Choi *et al.*, 1999a). Em infecção primária com *E. tenella*, as células CD4⁺ nas tonsilas cecais apresentam um pico aos 4 dias pós inoculação e são em maior número em aves resistentes que em aves sensíveis (Yun *et al.*, 2000b). Em infecção secundária, as células CD4⁺ se apresentam em maior número nas tonsilas cecais de aves sensíveis à coccidiose (Yun *et al.*, 2000b).

Células CD8⁺ aumentam em número no sangue periférico aos 8 dias pós infecção primária por *E. tenella*, à medida em que aumenta a proliferação de células T quando estimuladas por antígenos de *E. tenella* (Breed *et al.*, 1996). Coincidentemente com o aumento de linfócitos CD8⁺ no sangue periférico aos 8 dpi primária, ocorre também um pico de produção de IFN γ quando essas células são estimuladas com antígenos de *E. tenella* (Breed *et al.*, 1996). As flutuações nas populações de linfócitos T CD8⁺ coincidem com o início da recuperação da infecção primária (Breed *et al.*, 1996). Após infecções secundárias (4 – 8 dpi), as aves resistentes apresentam uma resposta local maior de células CD8⁺ que as aves sensíveis (Choi *et al.*, 1999b). Comportamento semelhante foi observado em outro estudo (Yun *et al.*, 2000b), no qual aos 4 dias pós infecção primária com *E. tenella*, as células CD8⁺ apresentam-se em maior número nas tonsilas cecais de aves sensíveis do que em aves resistentes. Por outro lado, após infecções secundárias, as células CD8⁺ se apresentam em maior número nas tonsilas cecais de aves resistentes à coccidiose (Yun *et al.*, 2000b). Aves tratadas com anticorpos monoclonais anti-CD8 e anti- $\alpha\beta$ TCR, para remover as subpopulações correspondentes de linfócitos T, produzem mais oocistos quando submetidos a infecção secundária por *E. acervulina* ou *E. tenella* (Trout e Lillehoj, 1996). Os IELs CD8⁺ parecem ser mediadores chave da imunidade celular intestinal contra coccidiose (Lillehoj e Lillehoj, 2000). Os linfócitos T CD8⁺ são citotóxicos e estão envolvidos na destruição de células hospedeiras infectadas, mas também são infectadas por esporozoítos de *E. tenella* e acabam servindo de transportador para o parasita no hospedeiro (Trout e Lillehoj, 1996).

Os linfócitos T $\alpha\beta$ TCR⁺, após infecções primárias por *E. tenella*, apresentam maiores números em tonsilas cecais de aves sensíveis a coccidiose que em aves resistentes; mas após infecções secundárias apresentam maiores números em aves resistentes (Yun *et al.*, 2000b).

Os linfócitos T $\gamma\delta$ TCR⁺, em mamíferos, são células CD4⁻ e CD8⁻ (Choi e Lillehoj, 2000). Em aves, os linfócitos T $\gamma\delta$ TCR⁺ podem ser CD8⁺ ou CD4⁺, mas podem ter origem

extra-timo (Yun *et al.*, 2000b). Em galinhas, essas células, estimuladas pela IL-2, são citotóxicas e participam na resposta imune contra *E. acervulina* (Choi e Lillehoj, 2000). Aves resistentes a coccidiose apresentam maiores números de linfócitos $\gamma\delta$ TCR⁺, em suas tonsilas cecais, tanto após infecções primárias por *E. tenella* como após infecções secundárias (Yun *et al.*, 2000b).

Estudos com aves sem Bursa de Fabrício evidenciaram pouca redução na capacidade de combater a coccidiose (Pierce e Long, 1965), a despeito da sua incapacidade de produzir anticorpos específicos. A capacidade de resistência a coccidiose em ratos cujos timos foram removidos foi reduzida tanto para infecções primárias quanto secundárias (Rose e Hesketh, 1979). Uma vez sendo a Bursa de Fabrício responsável pela produção de linfócitos B e, conseqüentemente, de anticorpos específicos responsáveis pela resposta imune humoral, e o timo sendo o local de origem dos linfócitos T, designados à resposta imune celular, concluiu-se primeiramente que a resposta imune à coccidiose seja dependente da resposta imune celular. Trabalhos mais recentes têm focado uma abordagem molecular em torno da identificação de citocinas e subconjuntos de linfócitos que medeiam a proteção celular (Lillehoj, 1998; Rothwell *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2006b; Hong *et al.*, 2006c; Hong *et al.*, 2008; Wallach, 2010). Padrões de expressão dessas citocinas, como IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-12, IL-15, IL-16 e IL-18 têm sido associadas a susceptibilidade ou resistência à infecção por *E. tenella* ou *E. acervulina* (Hong *et al.*, 2006b). Algumas citocinas, como a IL-2 e IL-15, têm a capacidade de estimular a proliferação linfócitos T e células natural killer (NK) (Hong *et al.*, 2006b), ambas responsáveis pela resposta frente a agentes parasitários intracelulares. Células NK foram descritas como pertencentes ao sistema imune inato e constituem uma linhagem linfocitária independente e altamente especializada (Vainio e Imhof, 1996; Yun *et al.*, 2000a). Possuem alta atividade lítica e são tidas como um dos principais fatores limitantes na infecção por bactérias e protozoários intracelulares (Krensky, 2000).

As células NK são mononucleares que não possuem memória, mas possuem atividade citotóxica não restrita por MHC. São também fenotipicamente caracterizadas como não-T, não-B e não-macrófagos (Lillehoj e Lillehoj, 2000). As células NK intestinais aumentam na galinha em resposta a infecções primárias e secundárias por *Eimeria*. Os IELs contêm uma subpopulação de NK que participam no controle da coccidiose, talvez pela citólise de células infectadas ou como fontes de Interferon gama (IFN- γ) (Lillehoj e Lillehoj, 2000).

Aves resistentes a coccidiose apresentam maior transcrição de mRNA de IFN- γ aos 4 dias pós infecção (dpi) primária e secundária nas tonsilas cecais e 8 dpi secundária no baço que as aves sensíveis (Choi *et al.*, 1999b). Yun *et al.* (2000b) também registraram maior transcrição de IFN- γ em aves resistentes após infecção primária (4 e 6 dpi nas tonsilas cecais e 8 dpi nos IELs); mas na infecção secundária apenas os IELs apresentaram maior transcrição de IFN- γ aos 8 dpi nas aves sensíveis. Nesse trabalho, parte do IFN- γ era transcrito por células CD4⁺, mas não por células CD8⁺ (Yun *et al.*, 2000b). A expressão do gene de IFN- γ como resposta a infecção por *Eimeria* em galinhas parece restrita ao local do intestino parasitado (Laurent *et al.*, 2001). Assim, em aves inoculadas com *E. tenella*, a expressão de IFN- γ detectada por qRT-PCR aos 7 dias pós inoculação é restrita ao ceco, enquanto em aves inoculadas com *E. maxima*, é detectada no jejuno e no íleo (Laurent *et al.*, 2001). O IFN- γ em galinhas, ativa os linfócitos e aumenta a expressão de MHC de classe II, sendo que a sua produção é positivamente associada à imunidade à coccidiose (Lillehoj e Lillehoj, 2000). Fibroblastos transfectados com gene de IFN- γ , e utilizados para cultivo celular de *E. tenella*, inibem o desenvolvimento desse coccídio (Lillehoj e Lillehoj, 2000). Outros estudos têm mostrado que o IFN- γ estimula a expressão de MHC de classe I e II em macrófagos, fibroblastos e células epiteliais e inibe a multiplicação de *E. tenella* em cultivos celulares com essas células (Heriveau *et al.*, 2000). Camundongos deficientes em IFN- γ apresentam aumento da liberação de oocistos e alta mortalidade por *E. vermiformis*, mas não frente à *E. pragensis* (Lillehoj, 1998), mostrando a complexidade da resposta imune a coccídios. Essa autora evidenciou que animais deficientes em IL-12, mas não em IL-10, são mais susceptíveis a infecção por *E. vermiformis*, sugerindo que a imunidade por IFN- γ dependente de IL-12 seja crucial para defesa contra esse patógeno. Cultura de fibroblastos de galinha tratada com IFN- γ não evidenciou efeito na infecção celular por esporozoítos de *E. tenella*, mas mostrou significativa redução na capacidade de desenvolvimento intracelular, e galinhas tratadas com o mesmo IFN- γ mostraram diminuição na liberação de oocistos após infecção por *E. tenella* e *E. acervulina* (Lillehoj e Choi, 1998).

Existem três formas de fatores transformantes de crescimento- β em galinhas, sendo elas: TGF- β 2, TGF- β 3 e TGF- β 4 (Lillehoj e Lillehoj, 2000). Ao contrário de aves sensíveis

a coccidiose, as aves resistentes apresentam alta expressão de mRNA de TGF- β 4 no baço, após infecção primária e secundária, e nas tonsilas cecais, após infecção secundária por *E. acervulina* (Choi *et al.*, 1999b).

A expressão de mRNA para IL-1 β , detectada com RT-qPCR, no ceco de aves 7 dias após infecção por *E. tenella*, aumenta em até 80 vezes, indicando a importância dessa citocina na infecção (Laurent *et al.*, 2001).

A Interleucina 2 em galinhas atua como um fator de crescimento para os linfócitos T $\gamma\delta$ TCR⁺ e tem mostrado participação na imunidade celular contra *E. acervulina* (Choi e Lillehoj, 2000). A injeção subcutânea de DNA para IL-2 aumenta as populações de linfócitos CD8⁺ e de $\gamma\delta$ TCR⁺ em galinhas; e a inoculação com oocistos de *E. acervulina* aumenta a expressão de mRNA para IL-2 nos linfócitos do baço e intraepiteliais do duodeno e aumenta as percentagens de linfócitos T $\gamma\delta$ TCR⁺ no duodeno 8 dias pós infecção primária e 4 dpi secundária (Choi e Lillehoj, 2000). Os níveis de IL-2 no soro de aves aumenta aos 7 dias pós infecção primária e aos 5 dias pós infecção secundária por *E. tenella* em comparação a aves não inoculadas (Miyamoto *et al.*, 2002).

Choi *et al.* (1999a) clonaram o gene para IL-15 (Interleucina 15). Essa citocina promove o crescimento de linfócitos T $\gamma\delta$ TCR⁺, aumenta a atividade de linfócitos NK e têm a sua expressão aumentada após infecções primárias e secundárias por *E. acervulina* (Lillehoj e Lillehoj, 2000).

As galinhas produzem fator semelhante ao fator de necrose tumoral (TNLF) após infecção por *E. tenella*, e as aves de linhagem resistente apresentam ainda maior produção, mas os efeitos dessa citocina sobre o curso da coccidiose parecem contraditórios (Zhang *et al.*, 1995). Produção excessiva de fator de necrose tumoral (TNF) por aves resistentes, infectadas com *E. tenella*, pode ser causa de perda de peso nessas aves (Zhang *et al.*, 1995).

Além da resposta celular, imprescindível para a proteção em infecção primária, a resposta humoral pode auxiliar contra uma reinfecção. Desde os primeiros estudos com *Eimeria* de galinhas é reconhecido o papel da imunidade na proteção das galinhas frente a surtos por coccidiose, sendo inclusive utilizada na descrição das espécies (Reid, 1990). Há alguns anos, diversos autores (Long *et al.*, 1986; Stiff e Bafundo, 1993) obtiveram imunidade parcial ou absoluta (Pierce *et al.*, 1962) através de diversos esquemas de inoculação das aves com diferentes doses de oocistos. Em geral, no entanto, a imunidade não é absoluta, protegendo as aves contra os efeitos da infecção, mas permitindo uma pequena produção de oocistos que, ao reinfetarem as aves, estimulam um reforço de

imunidade (Pierce *et al.*, 1962; Williams, 1995; Talebi e Mulcahy, 2005). Ao se tornar absoluta, a imunidade interrompe completamente a produção de oocistos. No caso de *E. tenella*, o desenvolvimento de imunidade, medido pela produção de oocistos entre 5 e 9 dias pós inoculação, é inversamente proporcional ao número de oocistos utilizados na infecção primária (Yun *et al.*, 2000b). Assim, aves primo inoculadas com 100 ou 1000 oocistos não desenvolvem imunidade, enquanto aquelas primo inoculadas com 10^4 , 10^5 ou 10^6 oocistos produzem um número cada vez menor de oocistos após infecção secundária de 10^5 oocistos (Yun *et al.*, 2000b). Foi demonstrado que anticorpos IgY transferidos do soro de animais convalescentes é capaz de imunizar e proteger aves em uma primoinfecção (Wallach, 2010). Dessa mesma maneira, esses anticorpos poderiam ser utilizados para imunizar galinhas jovens (Lee *et al.*, 2009a; b).

Anticorpos das classes IgG (IgY), no soro, e IgA, na bile, são detectados a partir de uma semana após infecção por *Eimeria* spp. e persistem por mais 2 meses, havendo dúvidas sobre sua importância na imunidade protetora frente a coccidiose (Lillehoj e Lillehoj, 2000). Possivelmente, anticorpos específicos aos parasitas podem reduzir a infectividade como consequência de aglutinação dos esporozoítos e merozoítos, neutralização, redução de motilidade, alterações conformacionais nos receptores dos parasitas para as células hospedeiras, e também devem inibir o seu desenvolvimento intracelular (Lillehoj e Lillehoj, 2000).

Os métodos de controle de coccidiose em prática hoje – profilaxia e vacinação com o parasito – dão resultados subótimos de proteção (Del Cacho *et al.*, 2011). Esses autores apresentaram uma forma de imunizar galinhas usando antígenos (esporozoítos) apresentados por células dendríticas. Seus resultados indicam presença de células contendo o antígeno nas tonsilas cecais e no baço já um dia após a imunização.

Considerando que o uso de quimioterápicos deve ser gradativamente mais combatido pelos mercados consumidores (Jie e Liu, 2011) e que a vacinação tem sido pouco efetiva (Velkers *et al.*, 2012), a seleção genética focada em características da resposta imune inata tem o potencial de proporcionar ganhos em resistência a um amplo espectro de patógenos (Jie e Liu, 2011), com menor probabilidade de ocorrência de efeitos indesejados (Bishop *et al.*, 2011).

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo identificar genes de resistência a coccidiose através da comparação do perfil de expressão gênica no baço de três linhagens de aves geneticamente distintas que apresentam diferenças quanto à susceptibilidade à infecção por *Eimeria tenella*.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar genes diferencialmente expressos no baço de aves de postura (CC, selecionada, e CCc, não selecionada) e aves de corte (TT), que demonstram diferentes resistências a infecção por *Eimeria tenella* e relacionar com mecanismos moleculares de resistência a coccidiose.
- Avaliar o efeito da seleção genética artificial de aves para características de produção de ovos no comportamento de genes relacionados com ao sistema imune.
- Identificar o comportamento da expressão gênica de *NK-lisina* em resposta à infecção por *Eimeria tenella* no baço de aves TT, CC e CCc.

4. Materiais e Métodos

4.1 Linhagens genéticas

O estudo de resistência genética à coccidiose foi realizado comparando a expressão diferencial de genes do sistema imune em três diferentes linhagens de galinhas: uma linhagem de corte (TT), e duas de postura (CC e CCc). A população CCc consiste de uma população de CC que não sofreu seleção genética para nenhuma característica, permanecendo com acasalamentos ao acaso, sendo mantidas como uma população controle de CC. As populações TT e CC, por sua vez, sofreram seleção genética para características produtivas com correlação genética negativa. Os animais TT foram desenvolvidos a partir de cruzamentos de animais das raças New Hampshire, White Plymouth Rock e White Cornish. Essa linhagem passou por 12 gerações de seleção com objetivo de melhorar peso vivo, conversão alimentar, consumo de ração e rendimento de carcaça (Figueiredo *et al.*, 2003a). Por outro lado, a linhagem CC foi obtida a partir da raça White Leghorn, selecionando animais durante 10 gerações para alta taxa de postura de ovos, peso e qualidade do ovo, viabilidade, maturidade sexual, fertilidade, eclobilidade e redução do peso vivo (Figueiredo *et al.*, 2003b).

Em estudo anterior, animais TT e CC, além de animais da linhagem CCc (linha CC sem sofrer processos de seleção), foram desafiados com oocistos de *Eimeria tenella* e avaliados quanto às características de resistência a coccidiose (Bertani, et al., 2005). Verificou-se maior índice de mortalidade entre as linhagens, sendo de 35% em animais da linhagem de rápido crescimento (TT) e 18,7% nos animais de alta fertilidade (CC). Houve também, maior liberação de oocistos em períodos de 24 horas pelos animais TT em comparação aos animais CC e CCc.

4.2 Desafio das aves e colheita de tecidos

Esta atividade foi conduzida na Embrapa Suínos e Aves, em Concórdia, SC. Ao todo, 60 aves CCc, 30 TT e 30 CC foram desafiadas oralmente com 30.000 oocistos de *Eimeria tenella* no sétimo dia de vida e o baço, ceco e tonsilas cecais das aves foram colhidos antes da infecção (d0) e 2, 6 e 9 dias pós-infecção (dpi).

O primeiro experimento focou a caracterização dos órgãos do sistema imune das aves frente a uma infecção por *E. tenella*. Baço, ceco e tonsilas cecais foram avaliados devido à sua importância como tecido linfóide (baço e tonsilas) e por ser o local de infecção por *E. tenella* (ceco). Os tecidos foram colhidos e pesados logo após o abate das

aves, sendo imediatamente congelados em nitrogênio líquido (-196 °C) (Figura 5). Ao término das coletas, o tecido foi transferido para conservação em ultrafreezer a -80 °C.

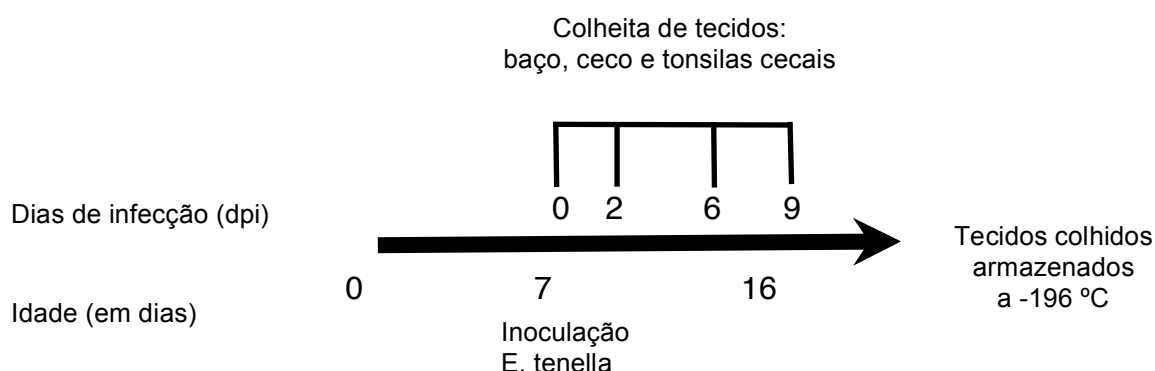


Figura 5. Esquema de infecção e colheita de tecido para a caracterização da expressão gênica.

4.3 Contagem de oocistos

A contagem de oocistos fecais foi realizada de forma pontual utilizando-se as fezes que se encontravam no ceco no momento do abate nos diferentes dias após infecção. O conteúdo cecal das fezes foi pesado, diluído em solução supersaturada de cloreto de sódio (1 g de fezes para 14 mL de solução supersaturada de cloreto de sódio) e homogeneizado em um liquidificador para se obter uma suspensão de oocistos. A contagem foi realizada utilizando-se a técnica de McMaster (Zajac, 1999) com auxílio de um microscópio. Três contagens independentes de cada amostra foram realizadas e os resultados foram calculados baseando-se no fator de diluição e apresentados em número de oocistos por grama de fezes.

4.4 Extração de RNA total

O RNA foi obtido pelo método do TRIzol[®] Reagent (Invitrogen[®]) modificado, para extração simultânea de RNA e proteínas, seguindo o protocolo descrito mais adiante.

Houve a preocupação inicial de preparar todo o material para reduzir ao máximo a ação de ribonucleases (RNAses). Para tanto, foi utilizado material descartável e água ultra-pura, proveniente do sistema de purificação Milli-Q, tratada com um potente inibidor de RNase, o dietil-piropicronato (DEPC) a 0,1% durante 12 horas e posteriormente autoclavada a fim de inativar tal composto.

A quantidade de material macerado variou de animal para animal segundo o peso inicial do baço, obtido instantes após o abate. Foi utilizado o reagente TRIzol[®] a 4 °C na

proporção de 1 mL de TRIzol[®] para cada 75 mg de baço. Os tecidos foram mantidos em nitrogênio líquido ou gelo seco até o momento de misturá-lo ao TRIzol[®]. Na sequência, segue a descrição detalhada dos procedimentos utilizados na extração do RNA.

1. Adição de 1mL de TRIzol[®] para cada 75 mg de baço em um tubo de vidro temperado;
2. Adição do tecido ao TRIzol[®] gelado seguido de trituração imediata utilizando-se um triturador elétrico Labo-Stirrer (Yamato Scientific Co., Japão) por até 30 segundos;
3. Incubação por 5 minutos a temperatura ambiente;
4. Transferência de 1 mL da solução para microtubos de polipropileno de 1,5 mL (Axygen) durante o período de incubação;
5. Adição de 200 µL de clorofórmio seguido de agitação por 15 segundos. Incubação a temperatura ambiente por 2 a 3 minutos;
6. Centrifugação a 12.000 x g por 20 minutos a 4 °C;
7. Transferência da fase aquosa a um novo microtubo devidamente identificado. Nesta etapa, a fração fenólica foi estocada a -80 °C para posterior análise de proteínas;
8. Adição de volume adequado (25%) de Solução Salina (0.8 M NaCl, 1.2 M citrato de sódio);
9. Adição de 33% de isopropanol ao sobrenadante, em relação ao volume final, sobrenadante + Solução Salina;
10. Incubação por 10 minutos à temperatura ambiente;
11. Centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4 °C;
12. Remoção do sobrenadante seguido de lavagem do *pellet* através da adição de 1 mL de etanol 75%;
13. Centrifugação a 10.000 x g por 5 minutos a 4 °C;
14. Remoção do sobrenadante e secagem do *pellet* por 5-10 minutos;
15. Ressuspensão do *pellet* em 50 µL de água DEPC;

4.5 Análise de pureza, concentração e integridade do RNA

Uma vez tendo sido extraído o RNA total, a pureza, concentração e integridade das amostras foram averiguadas por meio de espectrometria em luz UV e gel de agarose desnaturante a 1%, respectivamente.

Ácidos nucleicos possuem a propriedade de absorver luz no comprimento de onda de aproximadamente 260 nanômetros (nm), enquanto as proteínas, que frequentemente são carregadas com a extração de ácidos nucleicos absorvem a 280 nm. Assim, a análise da pureza e concentração das amostras de RNA total é feita incidindo um feixe de luz ultravioleta sobre a amostra, capturando a quantidade de luz que por ela passou, chegando ao detector e subtraindo esse valor da quantidade emitida. O valor obtido refere-se à absorbância (A), i.e., à capacidade de absorver luz em um dado comprimento de onda. Então, ao medirmos a absorbância a 260 nm (A_{260}), estaremos avaliando a concentração de ácidos nucleicos presentes naquela amostra. De modo similar, ao medirmos a absorbância a 280 nm (A_{280}), avaliamos a concentração de proteínas na amostra – um indicativo de contaminação. A pureza de uma amostra de RNA, portanto, pode ser verificada pela razão entre as duas absorbâncias medidas (A_{260}/A_{280}). O valor ideal para A_{260}/A_{280} é de $2,0 \pm 0,1$ quando as amostras estiverem diluídas em soluções com pH entre 7,5 e 8,5. Amostras de RNA diluídas em água ultrapura tendem a apresentar razões abaixo do ideal devido ao pH dessas soluções abaixo de 6,0.

A concentração das amostras pode ser verificada aplicando-se o seguinte cálculo:

$$\text{Concentração} = A_{260} \times 40 \times \text{FD (Fator de Diluição)}$$

em que, A_{260} é a absorbância a 260 nm, 40 é coeficiente de extinção para RNA, FD é o fator de diluição da amostra.

O preparo das amostras para quantificação foi realizado conforme descrito:

- Branco: 10 μL de PBS pH 7,5
- Amostras: 2 μL da amostra + 98 μL PBS pH 7,5

A análise de pureza e concentração foi feita em biofotômetro Biophotometer® (Eppendorf) e a integridade do RNA foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose desnaturante a 1% e visualizada sob luz ultravioleta, de acordo com o que segue:

Procedimentos para confecção do gel:

1. Preparação do suporte, posicionando o pente de modo a ficar no topo do gel.
2. Transferência do berço para a capela de exaustão.
3. Pesagem de 0,25 g de agarose em um Erlenmeyer;
4. Adição de 20 mL de H_2O -DEPC;

5. Aquecimento em Microondas até não mais visualizar os grumos na solução;
6. Resfrieração do gel até aproximadamente 65 °C.

Procedimentos em capela de exaustão:

7. Adição ao Erlenmeyer dos seguintes reagentes:
 - a. 2,5 mL de Formaldeído 40% (Vedco);
 - b. 2,5 mL de MOPS 10x (ácido 3-(N-Morfolino)propanosulfônico, Fluka);
 - c. homogeneização dos reagentes;
8. Verter mistura no suporte previamente preparado;
9. Utilização do gel após sua solidificação.

OBS: Soluções que contenham formaldeído nunca podem ser aquecidas por ocorrer liberação de gases tóxicos.

Procedimentos para o preparo das amostras:

1. Adição dos seguintes reagentes a um microtubo limpo:
 - a. 1 µL de MOPS 10X (Fluka);
 - b. 1,74 µL de Formaldeído 40% (Vedco);
 - c. 5 µL de Formamida (Ambion);
 - d. 3 µL amostra;
2. Incubação a 65 °C durante 15 minutos;
3. Colocação das amostras no gelo seguida da adição dos seguintes reagentes:
 - a. 2 µL de tampão da amostra (*Loading Buffer*, Ambion);
 - b. 1 µL de Brometo de Etídio (10 mg.mL^{-1} , Bio-Rad);
4. Aplicação de toda a amostra no poço do gel.

Tampão de Corrida: MOPS 1X.

Condições de Eletroforese: 90 V (5 V.cm^{-1}) e 350 mA durante 50 minutos.

4.6 Síntese de cDNA

A informação contida no RNA foi convertida em uma molécula mais estável, o DNA complementar (cDNA), para os estudos genômicos. O cDNA foi obtido utilizando

iniciadores oligo d(T), universais para RNA mensageiro, obtendo-se, assim, a informação exata do RNA mensageiro.

O processo de síntese do cDNA foi realizado com enzima Superscript II (Invitrogen) cujos procedimentos são descritos a seguir:

1. Quantidade inicial de 5 µg de RNA total;
2. Adição do volume correspondente aos 5 µg de RNA total em um microtubo limpo, livre de RNases;
3. Adição dos seguintes reagentes ao microtubo contendo o RNA total:
 - a. 1 µL de Oligo_(dT) (500 µg.mL⁻¹);
 - b. 1 µL de dNTP (10 mM cada);
 - c. H₂O DEPC q.s.p. 12 µL;
4. Incubação a 65 °C durante 5 minutos, seguida de incubação em gelo;
5. Adição dos seguintes reagentes ao tubo:
 - a. 4 µL de 5X First Strand Buffer;
 - b. 2 µL de DTT 0,1 M;
 - c. 1 µL de RNase out (40 U.µL⁻¹);
6. Incubação a 42 °C durante 2 minutos;
7. Adição de 1 µL de SuperScript II Reverse Transcriptase (200 U.µL⁻¹);
8. Incubação a 42 °C durante 50 minutos;
9. Incubação a 70 °C durante 15 minutos para cessar a reação;
10. Incubação em gelo até o momento do uso ou preservação em geladeira (4-10 °C).

4.7 Sequenciamento do gene *NK-lisina*

O sequenciamento de DNA da região transcrita do gene *NK-lisina* foi realizado para identificar polimorfismos existentes no gene entre as três linhagens. A sequência completa do RNAm do gene foi obtida por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação do cDNA previamente sintetizado. A reação se deu em um volume final de 25 µL, com 2,5 µL de tampão de reação 10X (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl, Invitrogen), 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM) 1 µL de cada iniciador (5 mM solução estoque), 0,5 µL de *Taq* DNA polimerase (5 U.µL⁻¹, Invitrogen), 0,25 µL de desoxirribonucleotídeos (dNTPs: dATP 10 mM, dGTP 10 mM, dCTP 10 mM, dTTP 10

mM), 1 µL de cDNA previamente sintetizado, completando o volume final com H₂O. A amostra foi desnaturada a 95 °C por 5 min para então ser amplificada em 35 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 30 segundos a 60 °C, e 45 segundos a 72 °C, em termociclador Mastercycler® gradient (Eppendorf). Nesta etapa, um segundo par de iniciadores foi utilizado, flanqueando toda a extensão do RNAm. Os primers contêm também sítios de reconhecimento por enzimas de restrição, como *HindIII* a fim de facilitar a posterior clonagem em plasmídeos, sendo a sequência do iniciador direto 5'–ACCGTCTAGAAATGGCCGCTGCTCTCATCGTGC–3' e o iniciador reverso 5'–ACCGAAGCTTTTCAGCCCTTGACAGCCCCAGG–3'.

O sequenciamento foi realizado através do sistema de análise genética Abi PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ. A análise da sequência nucleotídica e predição de aminoácidos foi realizada com auxílio da plataforma CLC Main Workbench 5.7.1 (CLC bio, Aarhus, Dinamarca).

O protocolo de sequenciamento utilizado, a partir do produto amplificado em PCR convencional, foi o seguinte:

A. Procedimentos para a purificação, por lise alcalina, de DNA a partir de produto de PCR utilizando-se o Minielute PCR Purification Kit (QiaGen).

1. Adição de 5 volumes de tampão de ligação (PB) para cada volume de produto de PCR;
2. Transferência para coluna e centrifugação a 4000 rpm 1 min;
3. Descarte do sobrenadante;
4. Lavagem do DNA na coluna através dos seguintes procedimentos:
 - a. Adição de 750 µL de tampão de lavagem (PE) e centrifugação a 13000 rpm durante 1 minuto;
 - b. Descarte do eluato;
 - c. Centrifugação por mais 1 minuto sem nenhuma solução para garantir a remoção de todo o tampão de lavagem adicionado e também de fragmentos menores de 70 pb remanescentes;
5. Transferência da coluna para um microtubo de 1,5 mL limpo;
6. Adição de 10 µL de tampão de eluição (EB) no centro da membrana, sem tocá-la;

7. Incubação por 1 min a Temperatura ambiente;

8. Centrifugação a 13.000 rpm durante 1min;

Nota: se necessário, repetir a eluição recolocando o sobrenadante na coluna para uma segunda centrifugação nas mesmas condições;

9. Armazenagem a -20 °C ou correr gel de agarose a 1%.

B. Procedimentos para a adição de dATP (opcional, não foi realizado nesse trabalho devido ao fato do PCR ter sido realizado com Taq DNA polimerase que já adiciona desoxirribonucleotídeos Adenosina nas extremidades):

1. Adição de 6 µL de PCR purificado

2. Adição de 1 µL de tampão 10X + Mg^{+2}

3. Adição de 2 µL dATP

4. Adição de H₂O q.s.p. 10 µL

5. Incubação a 70 °C por 45 minutos.

C. Procedimentos para ligação do produto de PCR purificado ao vetor:

1. Adição de 0,5 µL de vetor de clonagem pDrive (Invitrogen)

2. Adição de 1 µL de produto de PCR

3. Adição de 1 µL de H₂O

4. Adição de 2,5 µL da solução de ligação (*Ligation Master Mix*) para obter um volume final de 5 µL

5. Transferência de 2,5 µL para a bactéria

D. Procedimentos para transformação por eletroporação:

1. Inativação de enzimas a 70°C por 10 min;

2. Transformação de *E. coli* DH5α em eletroporador BTX ECM 830 em cuvetas de 1 mm de largura através dos seguintes procedimentos:

a. Adição de 50µL de suspensão contendo *E. coli* DH10B (10^9 UFC.mL⁻¹) (Invitrogen)

b. Adição de 2µL reação de ligação inativada

c. Condições da eletroporação:

i. Diferença de potencial: 2,75 kVolts

ii. Pulsos: 5

iii. intervalo entre pulsos: 1 s

iv. Duração de Pulsos: 99 μ s

3. Crescimento das bactérias em meio SOC (triptona + extrato de levedura) a 37 °C durante 1 hora sob agitação (150 rpm);

4. Plaqueamento das bactérias em Agar contendo meio Luria-Bertani com ampicilina, adicionando 10 μ L de IPTG (Isopropil tiogalactosídeo, 1M) e 20 μ L de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo, ou X-galactose) (50 g.mL⁻¹) no momento de utilização e incubação em estufa a 37 °C durante 15 a 18 horas.

O fragmento de interesse do gene de NK-lisina de galinha foi inserido dentro da região do gene *LacZ* do vetor de clonagem. O produto desse gene é uma β -galactosidase, que promove a hidrólise de β -galactosídeos, como a lactose. Desse modo, colônias de bactérias que possuam o plasmídeo com o inserto interrompendo o gene *LacZ*, serão incapazes de metabolizar β -galactosídeos devido à ausência de funcionalidade do gene. A seleção dos clones com o inserto foi então realizada de acordo com a coloração da colônia obtida em meio contendo o β -galactosídeo modificado X-gal, um análogo da lactose. Esta última é composta por uma molécula de glicose unida a uma galactose, enquanto no X-gal há uma substituição da glicose pelo 5-bromo-4-cloro-3-hidroxindol, um precursor de 5-bromofenol, de coloração azul. As bactérias capazes de metabolizar β -galactosídeos irão hidrolisar X-gal em galactose e 5-bromofenol, que se deposita no interior da bactéria, corando-a de azul. Já as bactérias com o gene *LacZ* não funcional, como é o caso dos plasmídeos carregando o inserto nessa região, não metabolizarão X-gal, permanecendo com coloração branca. As colônias brancas foram cuidadosamente coletadas e tiveram o DNA plasmídeo extraído por mini-preparação de DNA usando o kit comercial QIAprep® Spin Miniprep (QiaGen), conforme instruções do fabricante. Após extração do DNA, as amostras foram testadas, via PCR, para confirmar a presença do inserto de NK-lisina. Os clones portando o inserto foram estocados a -80 °C em meio LB líquido com 20% de glicerol.

4.8 Análise da expressão gênica

4.8.1 Microarranjos

Esta atividade foi realizada no laboratório de Biologia Molecular do LIKA. O perfilamento da expressão gênica das linhagens foi feito por meio de hibridação de dois

canais, marcando os aRNAs (RNAs amplificados e modificados com *Aminoallyl*) com os fluoróforos cianina 3 (Cy3 - verde) e cianina 5 (Cy5 - vermelho). As hibridações foram realizadas comparando se a linhagem CC versus CCc e CC versus TT (tabela 1), pertencentes ao mesmo período de infecção (d0 ou dpi2). Ao todo, 8 animais de cada linhagem em cada período pré- ou pós-infectivo foram avaliados da seguinte forma: as amostras de RNA do baço das aves de cada linhagem, em cada período analisado (pré- e pós-infecção), foram agrupadas em dois *pools* contendo quatro animais em cada *pool*. Para o primeiro *pool* de aves TT, utilizaram-se 4 animais (duas fêmeas e dois machos) do período pré-infecção (d0) e 4 aves (duas fêmeas e dois machos) do dpi 2. O segundo *pool* de aves TT foi feito exatamente da mesma forma, mas com outros 4 animais (duas fêmeas e dois machos em cada *pool*) de cada período pré-infecção e 2 dias pós-infecção (dpi 2). Os *pools* de CC e CCc seguiram rigorosamente a mesma formação: 4 animais diferentes para cada *pool*, formados por duas fêmeas e dois machos cada.

O RNA das aves (em *pool*) foi hibridizado em uma mesma lâmina de microarranjo, cada linhagem sendo corada com um fluoróforo diferente. Cada hibridização com o mesmo par de *pools* foi realizada em duplicata, realizando-se a inversão dos fluoróforos utilizados na primeira hibridização. Este processo é conhecido como *dye swap* e é utilizado para se eliminar o efeito do corante. As comparações estão agrupadas na tabela 1. Assim, ao todo, cada análise entre linhagens em um mesmo período corresponde a dados de 8 animais de cada linhagem em 4 hibridizações em *dye swap*.

Foram utilizadas as lâminas de microarranjo *Chicken 13K*, produzidas pelo Centros Norte-americanos *Fred Hutchinson Cancer Research Center, University of Delaware* e o centro escocês *Roslin Institute* (Burnside *et al.*, 2005). Os arranjos possuem 13.007 genes obtidos a partir de tecidos linfóides de galinha doméstica (Burnside *et al.*, 2005).

O kit *Amino Allyl MessageAmp II aRNA amplification kit* (Ambion) foi utilizado em todo o processo. O mesmo provê todas as etapas, desde conversão de RNA em cDNA, até a transcrição *in vitro* do cDNA para aRNA. Essa transcrição *in vitro* amplifica a quantidade de RNA original na amostra para um RNA amplificado (aRNA), composto por uracilas (UTP) modificadas aptas a receberem uma amina reativa cianina 3 (Cy3) ou 5 (Cy5) (fluoróforos) que servirão para a quantificação da expressão gênica nos microarranjos.

Tabela 1. Esquema de hibridização nos microarranjos, agrupado por pool e estratégia de marcação para os dye-swaps.

Pool ¹	DPI ²	Comparação	Lâmina	Cy3 ³	Cy5 ³
1	0	4 CC x 4 TT	4805	TT	CC
1	0	4 CC x 4 TT	4835	CC	TT
1	0	4 CC x 4 CCc	4829	CCc	CC
1	0	4 CC x 4 CCc	4830	CC	CCc
1	2	4 CC x 4 TT	4841	TT	CC
1	2	4 CC x 4 TT	4836	CC	TT
1	2	4 CC x 4 CCc	4864	CCc	CC
1	2	4 CC x 4 CCc	4843	CC	CCc
2	0	4 CC x 4 TT	4855	TT	CC
2	0	4 CC x 4 TT	4844	CC	TT
2	0	4 CC x 4 CCc	4847	CCc	CC
2	0	4 CC x 4 CCc	4846	CC	CCc
2	2	4 CC x 4 TT	4854	TT	CC
2	2	4 CC x 4 TT	4856	CC	TT
2	2	4 CC x 4 CCc	4852	CCc	CC
2	2	4 CC x 4 CCc	4853	CC	CON

¹Bateria de Pool de animais. Cada pool é formado por 4 diferentes animais (2 machos e 2 fêmeas);

²Dias pós-infecção (0 = pré-infecção, 2 = dois dias pós-infecção)

³ As linhagens foram coradas alternando-se as cianinas (Cy3 ou Cy5) para realizar o dye-swap

As etapas de síntese de cDNA, purificação, marcação dos aRNAs e finalmente, a hibridização nas lâminas de microarranjos têm duração de 3 dias e a sequência de procedimentos está descrita a seguir:

Dia 1:

A. Transcrição reversa e síntese da primeira fita de cDNA:

1. Partindo de uma solução de 5 µg de RNA total adicionar 1 µL de T7 Oligo(dT) primer e, em seguida ajustar o volume para 12 µL com água tratada com dietil-pirocarbonato (DPEC);
2. Incubar a 70 °C por 10 minutos, seguido de resfriamento imediata das amostras em gelo;
3. Adicionar 8 µL de Reverse Transcriptase Master Mix;
4. Incubar as amostras a 42 °C por 2 horas.

B. Síntese da Segunda Fita de cDNA:

1. Adicionar 80 µL de *Second Strand Master Mix* a cada amostra;
2. Incubar a 16 °C por 2 horas.

C. Purificação do cDNA:

1. Adicionar 250 µL de *cDNA Binding Buffer* a cada amostra;
2. Passar a mistura pelo cartucho de filtração de cDNA (*cDNA Filter Cartridge*) a 10.000 x g por 1 minuto;
3. Lavar o cartucho de filtração com 50 µL de *Wash Buffer*;
4. Eluir o cDNA com 9 µL de água livre de nuclease aquecida a 55 °C. Incubar por 2 minutos;
5. Centrifugar a 10.000 x g por 2 minutos;
6. Repetir os passos 4 e 5.

D. Transcrição in vitro para a síntese de aRNA modificado com Amino Allyl

1. Adicionar 26 µL de solução de transcrição *in vitro* (*IVT Master Mix*) a cada amostra;
2. Incubar a 37 °C durante 14 horas;
3. Adicionar 60 µL de água livre de nuclease a cada amostra;

Dia 2: concomitantemente, proceder a pré-hibridação das lâminas e *lamínulas* (itens I e J)

E. Purificação de aRNA

1. Adicionar 350 µL tampão de ligação ao aRNA (*aRNA Binding Buffer*) a cada amostra;
2. Adicionar 250 µL de etanol 100% e homogeneizar através de pipetagem suave;
3. Passar das amostras pelo filtro de aRNA (*aRNA filter cartridge*) a 10.000 x g por 1 minuto;
4. Lavar com 650 µL de tampão de lavagem (*Wash Buffer*) a 10.000 x g por 1 minuto;
5. Eluir o aRNA com 100 µL de água livre de nuclease pré-aquecida a 10.000 x g por 2 minutos;
6. Quantificar do aRNA;

F. Marcação do aRNA

1. Ressuspender cada um dos CyDYE em 11 µL de DMSO;
2. Quantificar o aRNA e secar a vácuo;
3. Ressuspender o aRNA seco em 9µL de tampão de acoplamento (*Coupling Buffer*);
4. Adição de 11 µL do Dye preparado ao aRNA e homogeneizar;
5. Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos no escuro;
6. Adicionar 4,5 µL de Hidroxialamina 4 M e homogeneizar;
7. Incubar à temperatura ambiente por 15 minutos no escuro;
8. Adicionar 5,5 µL água livre de nucleases, completando o volume para 30 µL.

G. Purificação do aRNA marcado com o Dye:

1. Adicionar de 105 µL de tampão de ligação ao aRNA (*aRNA binding Buffer*) a cada amostra;
2. Adicionar de 75 µL de etanol 100% e homogeneizar através de pipetagem suave;
3. Passar as amostras pelo filtro de aRNA marcado (*Labeled aRNA cartridge*) a 10.000 x g por 1 minuto;
4. Lavar com 500 µL de tampão de lavagem (*Wash Buffer*);
5. Eluir o cDNA com 9 µL de água livre de nuclease aquecida a 55 °C. Incubar por 2 minutos;
6. Centrifugar a 10.000 x g por 2 minutos;
7. Repetir os passos 4 e 5.

H. Hibridação:

1. Adicionar de 1 µL de SDS 10% à amostra marcada;
2. Aquecer por 2 minutos a 99 °C;
3. Centrifugar sob velocidade máxima durante 3 minutos;
4. Transferir 15 µL de cada amostra para um novo microtubo, seguido de homogeinização;
5. Repetir os passos 2 e 3;

6. Aplicar 26 μ L sobre a lâmina de microarranjo, tomando o cuidado de não formar bolhas, nem encostar com a pipeta na lâmina;
7. Colocar de lamínula sobre a lâmina seguido de vedação da câmara de hibridização;
8. Incubar em banho-maria a 63 °C durante 14 horas, protegido da luz.

I. Lavagem das *lamínulas*:

1. Preparar a solução de lavagem de *lamínula* com a seguinte composição (1 L):
 - 70 g de *pellets* de NaOH;
 - 420 mL etanol 95%;
 - 280 mL H₂O ultrapura;
2. Dissolver os *pellets* de NaOH. Adicionar o etanol somente após a completa dissolução;
3. Lavar os recipientes de lavagem com água abundante. Colocar as *lamínulas* e cobrí-las por completo com solução de lavagem;
4. Agitar levemente (70 rpm) o recipiente de lavagem em agitador orbital durante 2 horas;
5. Enxaguar abundantemente das lamínulas com água deionizada por 4 a 5 vezes (completando com água deionizada e agitando, decantando);
6. Centrifugar imediatamente a 1000 rpm em tubo falcon de 50 mL durante 5 minutos;
7. Secar em forno a 50 °C por 2 minutos;
8. Armazenar em tubo falcon de 50 mL (Becton, Dickinson and Company), em ambiente totalmente livre de poeira.

J. Procedimentos de pré-hibridação da lâmina de microarranjo:

1. Preparar a solução de pré-hibridação:
 - 370 mL de água ultrapura
 - 125 mL de 20X SSC
 - 5 mL de 10% SDS
 - 15 g de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé)

2. Preencher o recipiente de pré-hibridização com a solução de pré-hibridação e colocá-lo em banho-maria a 42 °C. Nesta etapa, a água do banho maria deve estar no mesmo nível do da solução de pré-hibridização;
3. Aquecer a solução por 45 minutos;
4. Pré-aquecer a lâmina de microarranjo em forno seco a 65°C por 15 minutos;
5. Mergulhar imediatamente a lâmina na solução aquecida a 42 °C. O mergulho deve ser vigoroso e por 15 a 20 vezes seguido de repouso total da lâmina submersa por 1 hora. Durante o período de incubação, o recipiente deve permanecer coberto;
6. Remover a lâmina, transferindo-a imediatamente para uma vasilha contendo água ultrapura, e submetê-la a uma série de 15 a 20 mergulhos vigorosos;
7. Transferir imediatamente a lâmina para outro recipiente contendo isopropanol 100% (Sigma), mergulhando-a novamente por 15 a 20 vezes;
8. Centrifugar imediatamente por 5 minutos a 1.000 x g.

NOTA: Nunca permitir a secagem da lâmina ao ar livre.

K. Procedimentos de lavagem da lâmina de microarranjo (após hibridização):

1. Primeira lavagem:
 - a. Preparar a solução (50 mL por lâmina) de 1X SSC / 0,03% SDS (solução 1);
 - b. Mergulhar a lâmina na solução, movendo-a delicadamente, permitindo que a *lamínula* se solte;
 - c. Manter a lâmina submersa na solução em repouso por 2 minutos, protegida da incidência de luz;
2. Segunda lavagem:
 - a. Transferir a lâmina para um tubo de 50mL contendo uma solução 2 (1X SSC, sem SDS);
 - b. Mergulhar vigorosamente por 10 a 15 vezes para remoção de todo o excesso de SDS;

- c. Transferir imediatamente para um novo tubo contendo a solução 3 (0,2X SSC);
 - d. Agitar a 60 rpm protegido da luz por 20 minutos;
3. Terceira lavagem:
 - a. Transferência do slide para um novo tubo contendo 0,05X SSC;
 - b. Agitar a 60 rpm por 10 minutos;
4. Transferir de slide para um tubo *falcon* limpo e centrifugar imediatamente a 1.000 x g por 5 minutos.
5. Analisar estatisticamente os microarranjos.

A digitalização da lâmina foi realizada em scanner modelo *Axon GenePix 4000B* (*Molecular Devices*) com ganho no fotomultiplicador (*PMT gain*) de 600 para o comprimento de onda de 635 nm e 450 para o comprimento de onda de 532 nm, pixel definido em 5 μ m e duas varreduras de scan.

As imagens das lâminas foram arquivadas em formato de imagem TIFF, sem perda de resolução. A extração das informações de cada *spot* (gene) a partir da imagem das lâminas hibridizadas foi realizada com o software próprio do equipamento, *GenePix Pro 4.0*, sendo assim obtidos os dados para posterior análise estatística.

O primeiro passo para obtenção dos dados consiste no processamento das imagens. Tal processamento inclui a identificação do sinal de cada *spot* e a distinção do sinal de ruído de fundo ou de artefato. Para isso, uma grade molde do arranjo, fornecido pelo próprio fabricante das lâminas foi usado para delimitar a área de cada *spot*, sendo ajustado corretamente aos *spots* presentes em cada arranjo. Essa etapa foi realizada automaticamente através da função de autoajuste do software, sendo cada *spot* inspecionado visualmente de forma minuciosa a fim de ajustar *spots* mal alinhados e remover *spots* com artefatos (como poeira ou riscos) ou dentro de áreas cujo nível de ruído de fundo estivesse excessivamente acima das intensidades do *spot* em si.

Após a definição dos *spots*, procedeu-se a análise das intensidades de sinal em cada canal: 635 nm, correspondendo ao sinal de cianina Cy5, vermelha; e 532 nm, correspondendo à emissão de sinal de cianina Cy3, verde. Tal análise extraiu os dados de intensidade de *pixel* (fótons capturados) para cada canal, bem como a intensidade de ruído de fundo para cada canal, mediana, média e moda de distribuição das intensidades dentro do *spot*.

A partir dos dados extraídos, os resultados foram agrupados de modo a comparar as hibridizações entre CC e TT e entre CC e CCc. As análises estatísticas foram todas realizadas em programa estatístico R (R Development Core Team, 2009) com uso de pacotes Limma (Smyth, 2005) e ferramenta bioConductor (Gentleman *et al.*, 2004).

Os dados das imagens dos microarranjos foram salvos em arquivos texto, contendo informações para serem analisados em ambiente R a fim de obter a informação dos genes diferencialmente expressos. Para tanto, os dados de intensidade de sinal precisam ser normalizados antes de qualquer análise de expressão diferencial. Tal normalização visa corrigir qualquer viés causado por quantidades desiguais de RNA inicial, diferenças de marcação entre as amostras ou de eficiência de detecção de sinal de um ou outro fluoróforo (Causton *et al.*, 2003). A normalização foi realizada pelo método de regressão linear local ponderada Lowess (*Locally weighted linear regression*), que leva em consideração a razão do $\log_2(R/G)$ em função do $\log_{10}(R \times G)$, sendo R o valor de intensidade para o canal vermelho 635 nm (*Red*) e G o sinal de intensidade do canal verde, de 532 nm (*Green*) (Causton *et al.*, 2003). Essa função resulta no gráfico de razão-intensidade (R-I) e revela artefatos na medida da razão R/G, muito comum para *spots* de baixa intensidade (Causton *et al.*, 2003). O método de Lowess detecta desvios do comportamento esperado para a razão R/G (por exemplo, no caso de uma hibridização própria, i.e., uma amostra com ela mesma, deveria sempre resultar em razão R/G nula), e os corrige de acordo com a ponderação dos *spots* vizinhos através da regressão linear local ponderada para cada ponto do gráfico R-I e subtraindo o $\log_2(\text{razão})$ de melhor ajuste calculado do valor obtido experimentalmente em cada ponto como função do $\log_2(\text{intensidade})$ (Causton *et al.*, 2003).

A análise de genes diferencialmente expressos após a normalização dos dados foi realizada por meios de modelo linear com ajuste empírico bayesiano realizado com auxílio do pacote estatístico *Limma* (sigla em inglês para Modelos Lineares para Análise de Microarranjos), usado em ambiente R (Smyth, 2005). A idéia central desse procedimento é de ajustar um modelo linear para os dados de expressão de cada gene do arranjo através do logaritmo da razão 635/532 dos *spots* (Smyth, 2005). O ajuste empírico Bayesiano é utilizado para “tomar emprestado” informações entre os genes, tornando a análise mais estável (Smyth, 2005). O script utilizado para tais análises em R pode ser visualizado no Anexo 1, no qual consta um exemplo de análise comparativa entre as linhagens TT e CC.

Todos os genes encontrados na análise estatística cujos valores de P obtidos foram menores que 0,05 foram considerados diferencialmente expressos. No entanto, somente aqueles cujos valores de *LogFC* foram acima de 0,38 são relatados e estudados neste trabalho. *LogFC* representa o logaritmo da diferença de expressão de um determinado ponto do microarranjo entre diferentes amostras. Por exemplo, se compararmos a diferença de expressão de um gene hipotético A entre duas amostras X e Y, o *LogFC* indicará quantas vezes o gene foi mais expresso em uma ou outra amostra. Esse critério foi tomado a fim de avaliar apenas aqueles genes cuja expressão diferencial entre as linhagens foi, no mínimo, 30% superior para uma ou outra linhagem estudada.

4.8.2 PCR quantitativo em tempo real

A partir do cDNA sintetizado, conforme descrito acima, procedeu-se a análise de expressão do gene de *NK-lisina* pelo método de PCR quantitativo após reação de transcrição reversa (qRT-PCR) em tempo real em aparelho Rotor-Gene 3000 (Corbett Research).

Quatro animais de cada linhagem foram avaliados individualmente, sempre em triplicatas, para os níveis de expressão de *NK-lisina* e de um gene constitutivo, usado para normalizar os dados de expressão gênica.

As sequências de ambos os pares de iniciadores para a amplificação do gene de *NK-lisina* e GAPDH foram previamente descritas por Hong *et al.* (2006a), sendo descritos na tabela 2.

O qRT-PCR baseia-se na detecção e quantificação de um marcador fluorescente (SYBR® Green, Molecular Probes), cujo sinal está em proporção direta com a quantidade de produto de PCR em uma reação. SYBR® Green se liga à fita dupla de DNA e somente assim é capaz de emitir luz ao sofrer excitação luminosa (Giulietti *et al.*, 2001). Dessa maneira, a fluorescência aumenta com o acúmulo de produto de PCR.

Tabela 2. Sequência dos iniciadores de *NK-lisina* e GAPDH utilizados em qRT-PCR

Alvo	Sequência dos iniciador	Tamanho do produto amplificado (pb)	Número de Acesso
NK-lisina	5' – GATGGTTCAGCTGCGTGGGATGC – 3'	217	DQ186291
	5' – CTGCCGGAGCTTCTTCAACA – 3'		
GAPDH	5' – GGTGGTGCTAAGCGTGTTAT – 3'	264	K01458
	5' – ACCTCTGTCATCTCTCCACA – 3'		

A reação de qRT-PCR ocorreu em um volume final de 20 µL, contendo 1 µL de cDNA previamente sintetizado, 10 µL de SYBR® Green PCR MIX (Applied Biosystems™),

1 µL de cada iniciador (5 mM solução estoque), e água em quantidade suficiente para completar o volume. A amostra foi desnaturada a 95 °C por 10 min para então ser amplificada em 35 ciclos de 10 segundos a 95 °C, 10 segundos a 60 °C, e 15 segundos a 72 °C. Ao término da PCR uma curva de fusão foi sempre realizada para verificar a presença de um único fragmento de amplificação, e algumas amostras também foram analisadas por eletroforese para verificar a presença de uma única banda no gel.

A análise do qRT-PCR foi feita por quantificação relativa pelo método de $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Giulietti *et al.*, 2001; Livak e Schmittgen, 2001), em que $\Delta\Delta Cq = (Cq \text{ Gene candidato}_{\text{linhagem A}} - Cq \text{ Gene controle}_{\text{linhagem A}}) - (Cq \text{ Gene candidato}_{\text{linhagem B}} - Cq \text{ Gene controle}_{\text{linhagem B}})$. Cq representa o ciclo limiar, ou seja, o ciclo de qPCR no qual o aumento na fluorescência reportada acima do sinal basal foi primeiramente detectado. O nível de expressão dos genes de interesse foi comparado com a expressão do gene constitutivo (expresso uniformemente entre os diferentes tecidos e em diferentes estádios de desenvolvimento) GAPDH. As condições de ciclagem do gene constitutivo GAPDH foram idênticas às utilizadas para NK-lisina.

O teste t foi utilizado para comparar os resultados. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado como significativo.

A análise da expressão relativa de NK-lisina entre as linhagens está expressa em valores referentes à expressão apresentada pela linhagem CC antes da infecção.

5. Resultados

5.1 Caracterização de tecidos linfóides

Animais da linhagem de corte TT apresentaram ceco de maior peso (LSMEAN) em relação às duas linhagens de postura CC e CCc ($P < 0,01$) (tabela 3). Os animais das linhagens CC e CCc não apresentaram diferenças entre si em relação ao peso do ceco ao longo do curso da infecção.

Animais da linhagem de corte TT apresentaram tonsilas cecais maiores após infecção (a partir do dpi2) do que as linhagens CC e CCc ($P < 0,01$). Em relação este parâmetro, houve diferença de peso entre as três linhagens estudadas aos 9 dias pós-infecção ($P < 0,05$).

Com relação ao baço, observa-se um aumento no peso aos dois dias pós-infecção. Nos resultados expostos na tabela 3, não foi levado em consideração o peso corporal das aves. Análise adicional levando-se em consideração o peso corporal foi realizada nos tecidos após a infecção. Esses resultados estão apresentados na tabela 4 e figura 6. Houve diferença significativa no peso relativo do baço das aves TT em relação às duas linhagens de postura já no segundo dia pós-infecção, sendo menor em todos os dpi analisados. Em relação ao ceco e tonsilas cecais, as diferenças entre TT e as demais linhagens apareceram somente no dpi9. Aves TT apresentam, no dpi9, menor peso relativo de ceco e maior peso relativo de tonsilas cecais.