

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CÊNCIAS BIOIÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA  
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

**PERFIL DE TRANSCRIÇÃO DO TLR3 E INTERFERON DO TIPO I EM  
GALINHAS INFECTADAS COM O VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA (VBI)**

RAYANA RODRIGUES SILVA

ORIENTADOR:  
PROF. DR. GIOVANI ROTA BERTANI

CO-ORIENTADORA:  
PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA

RECIFE – PE  
2012

RAYANA RODRIGUES SILVA

**PERFIL DE TRANSCRIÇÃO DO TLR3 E INTERFERON DO TIPO I EM  
GALINHAS INFECTADAS COM O VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA (VBI)**

Dissertação apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

RECIFE –PE  
2012

Catálogo na fonte  
Elaine Cristina  
CRB 1728

**Silva, Rayana Rodrigues**

**Perfil de transcrição do TLR3 e interferon do tipo I em galinhas infectadas com o vírus da bronquite infecciosa (VBI)/ Rayana Rodrigues Silva. – Recife: O Autor, 2012.**

**75 folhas : il., fig., tab.**

**Orientador: Giovani Rota Bertani**

**Coorientadora: Maria Tereza dos Santos Correia**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2012.**

**Inclui bibliografia e anexos**

- 1. Bronquite infecciosa em ave doméstica**
- 2. Vírus- genética**
- 3. Expressão gênica I. Bertani, Giovani Rota (orientador) II. Correia, Maria Tereza dos Santos (coorientadora) III. Título**

**616.234**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2012-212**

RAYANA RODRIGUES SILVA

**Perfil de Transcrição do TLR3 E Interferon do Tipo I em Galinhas Infectadas Com O Vírus Da Bronquite Infecciosa (VBI)**

Dissertação apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

**Aprovado por:**

---

**Prof. Dr. Giovani Rota Bertani**

**Presidente**

---

**Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva**

---

**Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia**

---

**Profa Dra. Márcia Vanusa da Silva**

**Data: 28/02/12**

Á minha mãe e ao meu irmão, Fabrício, por todo incentivo e apoio, amor e dedicação.

## SUMÁRIO

**AGRADECIMENTOS**  
**LISTA DE ABREVIATURAS**  
**LISTA DE FIGURAS**  
**LISTA DE TABELAS**  
**RESUMO**  
**ABSTRACT**

<b>I.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
	<b>1.1</b> Vírus da Bronquite Infecciosa das Aves .....	16
	<b>1.2</b> Variabilidade Genética do VBI .....	20
	<b>1.3</b> Patogenia do VBI .....	21
	<b>1.4</b> Nefrite Associada ao VBI .....	22
	<b>1.5</b> Sistema Imune Inato na Infecção Viral .....	23
	<b>1.6</b> Receptores Toll like .....	24
	<b>1.7</b> Interferons .....	28
<b>II.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	33
<b>III.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	46
	Objetivo Geral .....	47
	Objetivos Específicos .....	47
<b>IV.</b>	<b>ARTIGO</b> .....	48
<b>V.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	66
<b>VI.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	68

## AGRADECIMENTOS

À Deus fonte inesgotável de energia que me fortalece todos os dias.

À minha mãe, Grinaurea admirável exemplo, mulher guerreira que sempre lutou pela felicidade de seus filhos, fortalecendo cada passo dos mesmos através de sua imensa ternura, braços fortes e coração puro. Mulher companheira, guerreira, lutadora, protetora, amiga, meu anjo... minha MÃE. Sempre procurou dar a melhor educação para seus filhos, mostrando o quanto e necessário a busca do conhecimento para continuar caminhando na vida.

Mainha obrigada pelo eterno amor, carinho e gratidão, pela confiança depositada em mim, e por sempre estar ao meu lado aonde quer que eu esteja.

Ao meu irmão, Fabricio, MEU MELHOR AMIGO que sempre me orientou e me mostrou que em cada experiência ha uma lição a ser aprendida, pelo seu incessante apoio e companheirismo. Meu carinho, admiração e respeito por você não tem fronteiras.

Ao meu namorado, Daniel, obrigada pela compreensão e companheirismo em todos os momentos.

Aos amigos da República Theca e aos demais familiares, agradeço por todo carinho e apoio...

Ao meu orientador, Dr. Giovani Bertani, obrigada pela oportunidade concedida e pelos ensinamentos transmitidos.

À Erik Amazonas, obrigada por gastar um “pouco” do seu dispendioso tempo para transmitir um pouco do seu conhecimento e experiência para mim. Muito OBRIGADA!

Aos colegas da turma de mestrado por todos os momentos e experiências compartilhadas.

Ao laboratório de Virologia (LAVITE) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM – FIOCRUZ/PE), por ceder toda infra estrutura necessária para o término do trabalho, e aos colegas que me acolheram.

Ao LIKA (Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami) onde foi desenvolvido a pesquisa.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa.

À Embrapa Suínos e Aves (SC), e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AAF** - Fator ativador de IFN- $\alpha$  (do inglês: *Activator factor of IFN- $\alpha$* )

**AP-1** – Proteína ativadora (do inglês: *Activator Protein*)

**APCs** - Células apresentadoras de antígenos

**CpG** - Sequências de DNA contendo citosina e guanina

**CD40** – do inglês: *Cluster differentiation 40*

**CD80** - do inglês: *Cluster differentiation 80*

**CD86** - do inglês: *Cluster differentiation 86*

**ChINF-I** - Genes Interferon I de galinhas

**chTLR3** - Receptores toll like 3 - galinhas

**DNA** – Ácido desoxirribonucléico (do inglês: *desoxirribonucleic acid*)

**DCs** - Células dendríticas convencionais

**DAMPs** - Padrões moleculares endógenos associados ao dano

**DEPC** – Dietil pirocarbonato (do inglês: *Diethyl pyrocarbonate*)

**dsRNA** – RNA de fita dupla (do inglês: *Double stranded RNA*)

**EDTA** – Ácido Etileno diamino tetracético (do inglês: *Ethylenediamine tetraacetic acid*)

**ESTs** –Etiquetas de sequências expressas (do inglês: *Expressed Sequence Tags*)

**FAO** - Organização para Agricultura e Alimentação

**GAS** - Sequência ativadora de INF $\gamma$

**GAPDH** – Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (do inglês: *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)

**HBV** - Vírus da Hepatite B

**HCV** - Vírus da Hepatite C

**HIV**- Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês: *Human Immunodeficiency Virus*)

**IBV** – Vírus da Bronquite Infecciosa (do inglês: *Infectious Brochitis Virus*)

**IFNAR – 1** – Receptor de Interferon tipo I (do inglês: *Receptor Interferon Type I*)

**IFNAR – 2** –Receptor de Interferon tipo II (do inglês: *Receptor Interferon Type II*)

**ICTV**- Comitê Internacional de taxonomia dos Vírus (do inglês: *International Committee for the Taxonomy of Virus*)

**IFN I** - Interferon tipo I

**IRFs** – Fatores regulatórios de Interferon (do inglês: *Interferon regulating factors*)

**IRF1** – Fator regulatório de Interferon 1 (do inglês: *interferon regulatory factor 1*)

**IRF2** - Fator regulatório de Interferon 2 (do inglês: *interferon regulatory factor 2*)

**IRF3** – Fator regulatório de Interferon 3 (do inglês: *interferon regulatory factor 3*)

**IFN  $\beta$**  - Interferon beta

**IFN  $\alpha$**  - Interferon alfa

**IKKs** – Complexo de proteína quinase

**INF $\gamma$**  – Interferon gama

**IgGs** – Imunoglobulina IgG

**ISGF3** - Fator genético 3 estimulador de INF (do inglês: *IFN-stimulated gene factor 3*)

**ISRE** - Elemento responsável pela estimulação de interferon (do inglês: *IFN-stimulated response Elements*)

**JAK1/JAK2** - Proteínas da família Janus kinases

**LCMV** - Vírus da Coriomeningite linfocítica

**LRR** – Repetições rica em Leucina (do inglês: *Leucine rich repeat*)

**LES** - Lúpus Eritematoso Sistêmico

**MAPKs** - Proteínas quinases ativadoras de mitógenos (do inglês: *mitogen activated protein kinases*)

**Mg C1** – Cloreto de Magnésio

**MHC** - Complexo de Histocompatibilidade Maior (do inglês: *Major Histocompatibility Complex*)

**MRPS27** – Proteína Ribossomal mitochondrial S27 (do inglês: *Mitochondrial Ribosomal Protein S27*)

**NK** - Células Natural Killer

**NF- $\kappa$ B** - Factor nuclear kappa B

**NDV** - *Newcastle Disease Virus*

**OIE** - Organização Mundial de Saúde Animal

**PAMPs** - Padrões Moleculares associados aos Patógenos

**PH** - Potencial Hidrogeniônico

**RNA** – Ácido Ribonucléico (do inglês: *ribonucleic acid*)

**RRP** - Receptores de Reconhecimento Padrão

**RT – PCR** – Reação em cadeia da Polimerase – Transcrição Reversa (do inglês: *Reverse transcription polymerase chain reaction*)

**SsRNA** – RNA fita simples (do inglês: *Single stranded RNA*)

**STATs** - *Signal transducer and activator of transcription*

**SPF** – Livres de patógenos específicos (do inglês: *Specific Pathogen Free*)

**TLRs** - Receptores Toll like (do inglês: *Toll like receptor*)

**TIR** – do inglês: *Toll Interleukin -1*

**TRIF** – do inglês: *Adaptor inducing IFN-beta*

**T CD8+** - Linfócitos T CD8

**TCov** – *Turkey Coronavirus*

**TBK1**- do inglês: *TRAF-family-member-associated NF-κB activator-binding kinase 2*

**Th1 CD4+** - Linfócitos CD4+ Th ou Auxiliares

**Tyk2** – Tirosina quinase 2 (do inglês: *Tyrosine kinase 2*)

**UTR** – do inglês: *Unstranlated region*

**VBI** - Vírus da Bronquite Infecciosa das Aves

**VSV** - Vírus da estomatite vesicular

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura dos TLRs (Toll like receptors) .....	25
<b>Figura 2:</b> Via de Sinalização do TLR3 .....	28
<b>Figura 3:</b> Via de Sinalização dos IFNs .....	30

## FIGURAS DO ARTIGO

**Figura 1:** Expression of the IFN $\alpha$  spleen of chickens infected with M41 and uninfected (control) at different times post infection (hpi) ..... 60

**Figura 2:** Expression of the IFN $\beta$  spleen of chickens infected with M41 and uninfected (control) at different times post infection (hpi) ..... 60

**Figura 3:** Expression of the TLR3 spleen of chickens infected with M41 and uninfected (control) at different times post infection (hpi) .....61

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Receptores Toll like de galinhas .....	26
---	----

## TABELAS DO ARTIGO

<b>Table 1:</b> qRT- PCR primer and sequence .....	59
<b>Table 2:</b> R-squared ( $R^2$ ) and efficiency of the genes studied .....	59

## FIGURAS DOS ANEXOS

<b>Figura 1:</b> Eficiência GAPDH .....	69
<b>Figura 2:</b> Eficiência MRPS27 .....	69
<b>Figura 3:</b> Eficiência $\beta$ - actina .....	70
<b>Figura 4:</b> Eficiência IFN $\alpha$ .....	70
<b>Figura 5:</b> Eficiência IFN $\beta$ .....	71
<b>Figura 6:</b> Eficiência TLR3 .....	71
<b>Figura 7:</b> Relação do peso da glândula de Harder das aves controles e infectadas em diferentes horas pós infecção .....	74
<b>Figura 8:</b> Relação do peso do baço das aves controles e infectadas em diferentes horas pós infecção. ....	74

## TABELAS DOS ANEXOS

<b>Tabela 1:</b> Número de amplificações da qRT-PCR – GAPDH .....	72
<b>Tabela 2:</b> Número de amplificações da qRT-PCR – MRPS27 .....	72
<b>Tabela 3:</b> Número de amplificações da qRT-PCR – $\beta$ actina .....	72
<b>Tabela 4:</b> Número de amplificações da qRT-PCR – IFN $\alpha$ .....	73
<b>Tabela 5:</b> Número de amplificações da qRT-PCR – IFN $\beta$ .....	73
<b>Tabela 6:</b> Número de amplificações da qRT-PCR – TLR3 .....	73
<b>Tabela 7:</b> Sequências dos primers utilizados na PCR em tempo Real .....	75

## RESUMO

A bronquite infecciosa das aves (BI) é causada por um vírus da família Coronaviridae e caracteriza-se por uma enfermidade contagiosa, de distribuição mundial. A presença de novas variantes do vírus tem trazido grandes perdas econômicas à indústria avícola. A grande variabilidade genética do VBI das aves, o difícil controle vacinal e as diferenças em patogenicidade principalmente a falta de conhecimento da interação patógeno-hospedeiro, surge à necessidade de maiores estudos relacionados à imunopatogênese viral para que possam auxiliar futuras abordagens de controle. O objetivo deste trabalho foi estudar o perfil de transcrição da resposta a infecção causada por uma cepa clássica (M41), através dos estudos de expressão gênica dos genes TLR3 e INF tipo I, envolvidos na resposta imune inata, em diferentes horas pós infecção. Nós demonstramos aqui que galinhas infectadas com a cepa clássica do Vírus da Bronquite Infecciosa (M41) apresentaram na fase inicial da infecção, primeiras (6,12,24) horas pós infecção, aumento na expressão de IFN $\alpha$ , seguido por uma supressão da via de sinalização TLR3 enquanto que os níveis basais de IFN $\beta$  permaneceram inalterados. O aumento imediato da resposta IFN $\alpha$  logo nas primeiras 6 horas pós infecção caracteriza esta citocina como principal mediadora da resposta inata à infecção pelo VBI (M41).

Palavras-chaves: Bronquite Infecciosa, Coronavírus, Imunopatogenia.

## ABSTRACT

Avian infectious bronchitis (IB) is caused by a virus of the family Coronaviridae and characterized by a contagious disease of worldwide distribution. The presence of new variants of the virus has brought huge economic losses to the poultry industry. The great genetic variability of the poultry VBI, the difficult vaccine control, and the differences in pathogenicity, mainly the lack of knowledge of host-pathogen interaction, arises the need for further studies related to the viral immunopathogenesis that can help future control approaches. The objective of this work was to study the transcriptional profile of the response to infection caused by a classical strain (M41), through studies of gene expression of genes TLR3 and INF type I, involved in innate immune response, at different hours after infection. We demonstrate here that hens infected with the classical strain of Infectious Bronchitis Virus (M41) showed during the initial phase of infection, the first 6, 12, and 24 hours after infection, increased expression of IFN $\alpha$ , followed by suppression of TLR3 signaling pathway, while the basal levels of IFN $\beta$  remained unchanged. The immediate increase of IFN $\alpha$  response in the very first 6 hours after infection characterizes this cytokine as the primary mediator of the innate response to infection by IBV (M41).

keywords: Infectious Bronchitis, Coronaviruses, Immunopatogenia.

## I - INTRODUÇÃO

---

## 1.1 VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA DAS AVES

O Vírus da Bronquite infecciosa (VBI), um coronavírus de galinhas (*Gallus gallus*), causa uma doença viral aguda e altamente contagiosa que provoca grandes perdas econômicas à indústria avícola em todo o mundo, apesar do uso rotineiro de vacinas vivas e inativadas comercialmente disponíveis (MONTASSIER *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2009). No Brasil, a Bronquite Infecciosa (BI) é uma doença endêmica, permanecendo como problema econômico importante para avicultura, apesar das tentativas de controle por vacinação. Os surtos no país têm ocorrido com frequência e com a emergência de novas variantes do vírus (MENDONÇA *et al.*, 2009).

A BI está incluída na lista da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e Organização para a Agricultura e Alimentação (FAO) como uma doença transmissível de notificação anual, que tem importância socioeconômica e implicações sanitárias, podendo trazer alguma repercussão a qualquer momento no comércio internacional de produtos e animais. Essa enfermidade ocorre em praticamente todas as regiões do mundo onde existe avicultura industrial. A doença foi descrita pela primeira vez em Dakota do norte, nos EUA, em 1930, sendo denominada de Bronquite Infecciosa por SCHALK & HAWN. No Brasil, identificada pela primeira vez em 1957 por HIPÓLITO *et al.*, 1957. Há evidências que a doença ocorra em todo país, e os últimos surtos registrados foram no ano de 2008. Quatro deles ocorreram no estado da Bahia, um no estado de Pernambuco e um no estado de Santa Catarina. VBI também foi isolado em São Paulo, Paraná, Rio de Janeiro, Rondônia (DI FABIO *et al.* 2000), Minas Gerais (ABREU *et al.*, 2006) e no Distrito Federal (OIE, 2008).

O VBI das galinhas pertence ao gênero Coronavírus, família Coronaviridae e ordem Nidovirales e é o protótipo dessa família (MONTASSIER *et al.*, 2008). Dentro do gênero, Coronavírus faz parte do grupo três, conforme estabeleceu a classificação do *Internacional Comittee for the Taxonomy of Virus* (ICTV), em 1993, a qual tomou como base as propriedades antigênicas e sorológicas, utilizando anticorpos poli e monoclonais, sendo que tais resultados foram posteriormente confirmados pelo sequenciamento genômico dos sorotipos mais relevantes desse vírus (CAVANAGH, 2005). Deve-se elucidar, ainda, que os grupos 1, 2 e 4 incluem coronavírus de mamíferos, enquanto que o grupo 3 reúne coronavírus isolados de aves, como VBI e outros geneticamente assemelhados a este mesmo vírus, ficando assim constituída: Coronavírus da Bronquite infecciosa, Coronavírus dos perus (TCoV), Coronavírus de faisões (PhCoV), Coronavírus de gansos, Coronavírus de marrecos,

Coronavírus de pombos e outros que ainda estão sendo estudados (CAVANAGH *et al.*, 1994; 1995; CAVANAGH, 2005; 2007).

São vírus envelopados, com um diâmetro médio de 120 nm, seu genoma é constituído por RNA de fita simples polaridade positiva de 28 a 32 kb que codifica quatro proteínas estruturais; glicoproteína Spike (S), pequena proteína de membrana (E), proteína integral de membrana (M) e a proteína do nucleocapsídeo (N) que interage com o RNA genômico (CAVANAGH E NAQUI, 2003). Os coronavírus também codificam um conjunto de proteínas acessórias cuja função é desconhecida e sabe-se que não são requisitadas para replicação *in vitro*, mas que pode empregar um papel na patogênese (CASAIS *et al.*, 2005; YOUNT *et al.*, 2005).

O VBI é resultante de uma mistura de mutantes genéticos, gerados por mutações pontuais, deleções, inserções, e recombinações que ocorrem durante a replicação do RNA viral. As mudanças ativas e constantes da população viral permitem a seleção da subpopulação de VBI melhor adaptada ao hospedeiro, garantindo sobrevivência longa do vírus na célula, no organismo, e na população hospedeira, levando as mudanças na patogenicidade e à emergência de novos patógenos virais. Sendo esses eventos responsáveis pela elevada variabilidade genética e antigênica do VBI. No campo, a consequência disso é o isolamento contínuo de novas estirpes variantes, que causam a quebra da imunidade conferida pelas estirpes vacinais, dificultando o emprego apropriado de programas de controle, uma vez que se observa um baixo grau de proteção cruzada entre os diferentes sorotipos (CAVANAGH e GELB, 2008; CAVANAGH, 2005).

A maior parte do que se conhece dos coronavírus em aves baseia-se no VBI, que é um patógeno de aves domésticas da espécie *Gallus gallus* que replica primariamente no trato respiratório, mas também em células epiteliais de outros órgãos, dentre os quais trato digestivo, reprodutivo e urinário (CAVANAGH e NAQUI, 2003; CAVANAGH, 2007). Os sinais clínicos típicos de BI consistem de respiração ofegante, tosse, espirros, estertores tráqueos-bronquiolares, corrimento nasal e às vezes, conjuntivite, sinusite, nefrite, nefrose, epididimite (IRITANI *et al.*, 1991; FARSANG *et al.*, 2002; CAVANAGH, 2007). Os sinais clínicos podem variar de acordo com a idade das galinhas, patogenicidade da cepa viral e nível existente de imunidade.

No Brasil, algumas variantes de campo têm sido isoladas nos últimos anos e classificadas genética e fenotipicamente em um grupo a parte, por apresentarem características peculiares que diferem das demais estirpes de referência e que foram isolados em outros países, sobretudo no que diz respeito à patogenicidade. Tais sorotipos se

caracterizam por induzirem lesões nas células epiteliais da mucosa do sistema respiratório, principalmente em aves jovens, causando alta morbidade e até mortalidade, podendo afetar outros órgãos como o rim e o sistema reprodutor, onde causam danos ovarianos levando a redução antecipada e prolongada na produção e qualidade do ovo em ave de postura ou lesões testiculares em machos reprodutores (CAVANAGH e NAQI, 2003; VILARREAL *et al.*, 2007).

Em 1991, na Inglaterra, começou a ser relatados em galinhas em produção vacinadas, sinais de doença com características incomuns a bronquite infecciosa. Estes surtos foram associados com um novo tipo de vírus, completamente diferente das amostras de VBI já descritas. O novo vírus foi denominado 793B por Gough *et al.*, 1992 e amostra 4/91 por Parsons *et al.*, também em 1992. A doença relatada apresentava mortalidade elevada e uma miopatia do músculo peitoral profundo (GOUGH *et al.*, 1992; APUD Cook, 1996). No Brasil, a partir de 2003, surtos “atípicos” de bronquite associados com a apresentação de um novo tipo de lesão, caracterizada por degeneração e necrose da musculatura peitoral, também foram observados (BRENTANO *et al.*, 2005). Nestes casos, o VBI foi isolado e confirmado por testes de RT-PCR. Foi possível reproduzir em aves *Specific Patogen Free* (SPF), doença respiratória e renal, tanto com lesões macroscópicas como microscópicas, mas não foi possível reproduzir as lesões de miopatia. Os autores concluíram pela necessidade de novos testes.

Em 2005, três isolados brasileiros de VBI envolvidos com casos de lesões respiratórias, renais, alterações na quantidade e qualidade dos ovos e miopatia foram sequenciados, a partir de produtos de PCR do gene S1 (BRENTANO *et al.*, 2006). Duas amostras apresentaram perfil relacionado às amostras nefropatogênicas do VBI e uma delas foi classificada como sorotipo Massachusetts. Os resultados de filogenia encontrados indicam não haver necessariamente relação entre sorotipo ou perfil genômico variante e as novas lesões de miopatia observadas. Porém, até o momento, somente um pequeno número de amostras foram sequenciadas e ainda não foi avaliada a presença do VBI no tecido muscular, independente da detecção em tecidos do sistema respiratório e renal. Uma das amostras sequenciadas foi utilizada para testes de desafio frente a uma vacina sorotipo Massachusetts (TREVISOL *et al.*, 2006). Os resultados demonstraram redução dos sinais clínicos, mas não da ciliostase e alta taxa de recuperação viral quando se comparou grupo vacinado e agredido com o grupo somente desafiado. No estudo, não houve completa proteção cruzada, e a possibilidade de rever programas vacinais e sorotipo vacinal é questionada, mas não respondida.

A presença de novas amostras “atípicas” do VBI no Brasil não é novidade, uma vez que em 1973, July e Hipólito comprovaram a presença de amostra nefropatogênica no país e a partir daquele ano, dados de soro epidemiológicos foram investigados e novos relatos de nefrite-nefrose foram novamente publicados em 1979 por Lamas *et al.* Foram a partir daqueles estudos que ficou comprovada a necessidade do uso de uma vacina para esta enfermidade em nosso país, fato que veio a ocorrer em 1978, com a liberação da vacina contendo sorotipo Massachusetts (DI FABIO, 2003). Inicialmente o resultado foi completamente satisfatório e ainda hoje apresenta um grau de eficiência. Em 1985, Brandem descreveu o isolamento de uma amostra com evidências de sorotipo Arkansas, em 1987, Di Fabio isolou amostras que apresentavam pouca relação antigênica com a amostra Massachusetts e em 1992, Wentz relata amostras com pouca relação antigênica com as amostras Massachusetts e Arkansas. Um dos dados científicos mais recentes sobre amostras “variantes” de BI no Brasil data de 2000, onde Di Fábio *et al* pesquisaram amostras de VBI em frangos e poedeiras e encontraram pelo menos cinco diferentes sorotipos. O fato de apenas recentemente a notificação para a doença se tornar obrigatória, justifica em partes, a insuficiência de dados de casos clínicos da doença no Brasil, mesmo sendo uma doença endêmica na avicultura mundial.

Em 1979, o Ministério da Agricultura aprovou e licenciou as vacinas vivas de BI contra as cepas Mass H120 e H52, importadas e nacionais, para serem usadas em todos os lotes de aves no Brasil. Em 1980, vacinas inativadas usando as mesmas cepas foram introduzidas. O sorotipo padrão, e o primeiro caracterizado no mundo e no Brasil, foi o Massachusetts.

Embora com o uso de vacinação, o controle da BI nunca foi, conforme relatos de campo, plenamente satisfatórios, sendo, porém, importante lembrar que não se tem dados de prevalência nacional atualizados no Brasil (ITO *et al.*, 2006). Sendo assim, é importante que se conheça os perfis filogenéticos destas amostras que se apresentam atualmente envolvidas com miopatia, para melhor caracterizar esta variante no país, gerando informações mais concretas sobre este novo sorotipo denominado VBI 4/91 em nosso país e determinar o grau de proteção conferido pela amostra vacinal Massachusetts frente às amostras isoladas no Brasil.

A despeito de existirem vacina vivas e inativadas contra o VBI, persistem grandes entraves para se estabelecer uma condição de controle mais efetivo da infecção nos plantéis avícolas, os quais estão mais diretamente relacionados ao aparecimento, entre essas mesmas aves de novos sorotipos ou variantes do agente etiológico, as quais são distintas das estirpes selvagens e vacinais. Em decorrência disso, no mundo todo, tem sido crescente a identificação

de variantes genéticas e antigênicas do VBI, tornando muito difícil o controle dessa enfermidade. Portanto, um programa específico de vacinação ou o desenvolvimento de vacinas específicas para uma imunoprofilaxia bem sucedida da BI requer uma avaliação mais acurada ou do VBI, ou do organismo hospedeiro, ou idealmente, da relação hospedeiro (aves)- vírus (VBI), no sentido de se entender melhor a própria pressão seletiva exercida pelas respostas imunes das aves sobre esse patógeno viral e que permeia o processo de variação pelo qual esse agente passa em sua evolução (MONTASSIER, 2008).

A avicultura brasileira tem lugar de destaque no cenário mundial, ocupando a primeira posição na exportação de carnes de frango e a terceira em termos de produção de carne e derivados de frango, é importante salientar que nos últimos anos houve um relevante avanço na produção de ovos pelo setor avícola de postura de nosso país, que além de atender toda demanda do mercado interno, tem potencial para ser destinado a suprir as necessidades do mercado externo (MONTASSIER, 2008).

A BI das galinhas exerce um impacto significativo em perdas econômicas no mundo todo, relacionada à diminuição do crescimento, comprometimento da qualidade e da produção de ovos, mortalidade, condenação no abate e gastos com insumos incluindo diagnóstico, vacinas, e antimicrobianos a fim de eliminar infecções bacterianas intercorrentes. Os prejuízos causados diretos e indiretos são de ordem de um milhão de dólares anualmente (JONES, 2010).

## **1.2 VARIABILIDADE GENÉTICA DO VBI**

Uma característica peculiar dos vírus RNA, é que os Coronavírus apresentam uma alta frequência de mutação a qual decorre principalmente dos mecanismos de falhas de correção (“proof-reading”) da enzima RNA polimerase, como também pelo fato de a transcrição do RNA genômico ser descontínua nos coronavírus e se processar em “saltos” (LAI, 1992). A evolução do VBI é um fenômeno relativamente freqüente, devido à alta capacidade de variabilidade genética desse vírus o que se traduz pelo aparecimento de alterações genéticas marcantes especialmente os genes codificadores das proteínas estruturais S e N, e em menor escala, das proteínas não estruturais ou até mesmo em regiões não codificadores (UTRs). Tais alterações genéticas conduzem mudanças relevantes nas características fenotípicas, como por exemplo, nas propriedades antigênicas e naquelas associadas à virulência e/ou a patogenicidade desse mesmo agente infeccioso. Para ilustrar melhor as consequências da grande variabilidade que ocorre entre as cepas do VBI, já foram descritos, em diversas partes

do mundo, mais que 20 sorotipos desse vírus (CAVANAGH e NAQI, 2003; CAVANAGH *et al.*, 1991; GELB *et al.*, 1991; KUSTERS *et al.*, 1989).

Sandri 2009, através do sequenciamento parcial da região codificadora da subunidade S1 da proteína S do IBV, identificou pelo menos quatro linhagens virais no plantel avícola brasileiro, sendo todos agrupáveis em um genótipo Brasileiro exclusivo, além da existência de amostras pertencentes ao genótipo 4/91 (793B, CRR8) e outras aos genótipos massachussets (SANDRI, 2009).

### **1.3 PATOGENIA DO VBI**

VBI infecta inicialmente o trato respiratório superior e, preferencialmente as células ciliadas e secretoras de muco desse sistema. O título infectante viral atinge valores máximos nas mucosas do nariz e traquéia, aos três dias após o início da infecção; permanecendo nesses patamares por mais dois a cinco dias. Com relação à capacidade de o VBI infectar outros órgãos do trato respiratório, estudos revelaram a presença de títulos virais similarmente elevados, nos pulmões e nos sacos aéreos (CAVANAGH e NAQI, 2003; CAVANAGH, 2007).

Embora a nomenclatura do VBI sugira que se trata de um patógeno apenas do trato respiratório, este vírus, além de se replicar em tecidos e órgãos desse sistema (nariz, traquéia, pulmão e sacos aéreos), causando lesões proeminentes nesses tecidos, apresenta também tropismo e patogenicidade para muitos outros tipos de células epiteliais, incluindo as que estão presentes na constituição dos rins, das células do oviduto ou dos testículos e muitos outros tipos celulares do trato gastrointestinal, que constituem, por exemplo, o esôfago, o proventrículo, o duodeno, o jejuno, a bursa de Fabrício, as tonsilas cecais, o reto e a cloaca (CAVANAGH, 2005). Infecções de tecidos entéricos geralmente não se manifestam clínica e patologicamente, não obstante quadros de proventriculite ou enterite podem ser desencadeados por determinadas cepas do VBI (CAVANAGH, 2005; 2007). Por outro lado, algumas estirpes do VBI são predominantemente nefropatogênicas, isto é, quando inoculadas em pintinhos de um dia de idade, reproduzem experimentalmente um quadro característico de nefrite, que culmina em elevada mortalidade. Alternativamente a esses patótipos do VBI, foram descritas algumas outras estirpes com uma predileção mais acentuada para replicação em tecidos gonadais, nos quais desencadeiam lesões e comprometimento do funcionamento normal desses órgãos, especialmente de ovários, de ovidutos e de testículos (PENSAERT e LAMBRECHTS, 1994, PEREIRA *et al.*, 2006).

Em vista disso, verifica-se que existem diferentes patotipos do VBI com capacidade de gerar lesões significantes nos sistemas respiratórios, urinário e reprodutor de aves de todas as idades, as quais podem acarretar severas perdas econômicas à indústria avícola. (CAVANAGH; NAQI, 2003; CAVANAGH, 2007).

#### **1.4 NEFRITE ASSOCIADA AO VBI**

Vários termos têm sido usados para descrever as lesões renais resultantes da infecção por VBI, em concordância com os achados histopatológicos o termo nefrite-nefrose parece ser o mais apropriado para as lesões, onde se observa inicialmente mudanças degenerativas nas células epiteliais do túbulo contorcido e reações inflamatórias no parênquima e interstício. Em nefrite induzida por VBI evidencia-se uma concomitante ocorrência de dano tubular e mudanças inflamatórias (SILLER e CUMMING, 1974). Partículas virais foram encontradas na superfície de células epiteliais e no lúmen do túbulo contorcido (GORYO *et al.*, 1984; TSUKAMOTO, 1996).

O Vírus foi algumas vezes isolado de rins não apenas em doença espontânea (e.g. WINTERFIELD e HITCHNER, 1962; CUMMING, 1963; MINARIK, 1967 APPUD SILLER, 1981), mas também de rins experimentalmente infectados (HITCHNER, 1970; JONES, 1974; MACDONALD e MCMARTIN, 1976; PURCELL *et al.*, 1976; MACDONALD *et al.*, 1980 APPUD SILLER, 1981). Mesmo cepas de vacinas não nefrotrópicas, como por exemplo, H 120, que não causa lesão renal pode ser recuperada dos rins de aves infectadas (MACDONALD e MCMARTIN, 1976 APPUD SILLER, 1981). Outros estudos também demonstraram os efeitos deletérios de cepas VBI nefropatogênicas, onde foi observado nas aves infectadas sinais de nefrite, e em concordância com Siller, foi visto nesse estudo que uma cepa que não era caracterizada como nefropatogênica também causou nefrite intersticial, foi visto ainda que as lesões renais diferem entre as diferentes cepas. A cepa Wolgemuth, produziu nefrose com destruição das células tubulares na fase inicial da infecção e subsequente inflamação mononuclear ao redor dos túbulos; por outro lado, nas aves infectadas com as cepas Gray e CV56b, as lesões renais consistiram de células mononucleares agregadas no interstício que progrediu com o tempo para os túbulos proximais ocupando-o extensamente. Algumas cepas causam dano renal direto, outras atuam indiretamente, sugere-se que isto possa ser um mecanismo imuno-mediado, como evidenciado pela aparência histológica de numerosos agregados linfóides causados pelas cepas Gray e CV56b (LEE *et al.*, 2004).

## 1.5 SISTEMA IMUNE INATO NA INFECÇÃO VIRAL

O sistema imunológico é uma forma universal e evolutiva antiga na defesa do hospedeiro contra organismos infecciosos. O papel do sistema imune inato é primariamente reconhecer potenciais patógenos de si próprio. A função central deste sistema é o reconhecimento de organismos invasores e início da resposta para limitar a propagação de microorganismos patogênicos. O sistema imune inato é representado por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis (JANEWAY, 2002).

As principais células efetoras da imunidade inata são: macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células Natural Killer – NK. Fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento, bem como síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas são os principais mecanismos na imunidade inata. Esses mecanismos são ativados por estímulos específicos, representados por estruturas moleculares de ocorrência ubíqua em microorganismos, mas que não ocorrem na espécie humana. Moléculas tais como lipopolissacarídeos, resíduos de manose, ácidos teicoicos comumente encontrados na superfície de microorganismos, constituem Padrões Moleculares Associados aos Patógenos (PAMPs) e ativam a resposta imune inata, por interação com diferentes receptores, conhecidos como Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRP), dentre os quais a família dos receptores *Toll like* (TLRs) (ABBAS, 2008). Entre os vários RRP, os TLRs se destacam por seu papel central na ligação a patógenos e iniciação da resposta inflamatória. Esses receptores são expressos em uma variedade de células do sistema imune, tais como, monócitos, macrófagos, células dendríticas, células B, bem como em outros tipos celulares que não estão envolvidos diretamente na defesa do hospedeiro (HALLMAN; RAMET; EZEKOWITZ, 2001; TAKEUCHI, AKIRA, 2009).

Três grupos de PRRs têm sido descrito no reconhecimento de componentes virais: os receptores de membrana, conhecidos como TLRs, receptores citosólicos, a família semelhante à helicase (RIG-1, NOD e MAD5) e os receptores secretados (AKIRA *et al.*, 2006; MIKKO *et al.* 2001). Como evidenciado, muitos receptores da imunidade inata podem participar da resposta à infecção viral, mas dentre estes, os TLRs tem sido descrito na literatura científica como principal responsável pelo reconhecimento de Padrão Molecular associado ao patógeno (PAMP) (KAISHO; AKIRA, 2002). A ativação destes receptores induz a produção de citocinas pró-inflamatórias e interferons, bem como sinais que recrutam e ativam células

envolvidas na inflamação e indução da resposta imune adaptativa (ROUSE e SEHRAWAT, 2010).

O Sistema imunológico atua numa rede de cooperação, envolvendo a participação de muitos componentes estruturais, moleculares e celulares. Nesse cenário se encontra o delicado equilíbrio entre a saúde e a doença, em que tanto a deficiência quanto o exagero resultam em dano tecidual. Apesar de a resposta imune constituir um mecanismo de defesa à infecção, em algumas situações ela pode contribuir para o dano tecidual (MACHADO *et al.* 2004).

A resposta de anticorpos a infecção viral pode contribuir para o dano tecidual. Isto ocorre quando anticorpos se ligam em células infectadas, ativam proteínas do sistema complemento e causam uma reação inflamatória. Alternativamente, as reações inflamatórias mediadas por anticorpos envolvem toxicidade seguida pela interação da porção Fc das imunoglobulinas IgG à receptores em células inflamatórias, o que provoca a liberação de mediadores inflamatórios; ou seguinte a deposição de complexos antígenos-anticorpo virais em capilares levando a ativação da cascata do complemento (RAVETCH, 2010).

Alguns vírus têm propriedades intrínsecas que tornam o controle imunológico difícil e a tentativa do sistema imunológico do hospedeiro em conter a infecção resulta em danos teciduais notáveis (KIMMEL, 1992; ROUSE e SEHRAWAT, 2010). Embora a resposta imune seja fundamental para a defesa contra a maioria dos agentes infectantes, têm sido acumuladas nos últimos anos evidências de que em muitas doenças infecciosas os principais aspectos patológicos não estão relacionados com uma ação direta do agente agressor, mas sim com uma resposta imune anormal.

## **1.6 RECEPTORES TOLL LIKE (TLRs)**

A família dos TLRs é a principal e mais estudada classe de PRR. O primeiro receptor da família *Toll* foi identificado em *Drosophila melanogaster* como componente de via de sinalização que controla a polaridade dorso ventral em embriões, e, além disso, com importante participação na resposta imune inata de moscas adultas, o que pode ser demonstrado pelo fato de moscas, com mutação que lhes confira perda de função do gene *Toll*, tornarem-se altamente suscetíveis a infecções fúngicas (MEDZHITOV, 1998). Estruturalmente os TLRs (Figura 1) são glicoproteínas integrais tipo I com domínio extracelular N-terminal com repetições ricas em leucina (LRR) e uma região conservada intracitoplasmática chamada domínio TIR (ROCK *et al.*, 1998). Já foram identificados pelo menos 10 TLRs em humanos, cada qual com uma especificidade para o reconhecimento de

diferentes PAMPs, proveniente de diferentes patógenos, incluindo vírus, bactérias, fungos e protozoários (AKIRA, 2006).

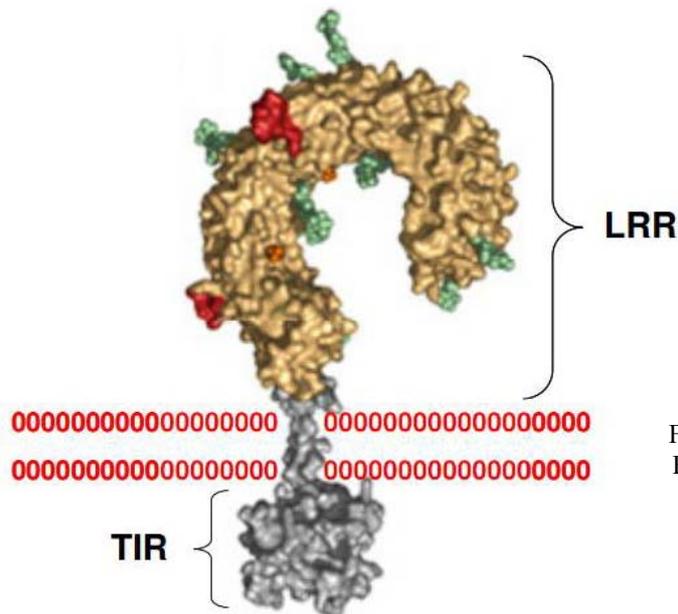


Figura 1. Estrutura dos TLRs (Toll like receptors)  
Fonte: ABBAS, LICHTMAN, 2008.

TLRs podem ser subdivididos em subfamílias de acordo com os PAMPs reconhecidos por eles. TLR1, TLR2, TLR4 e TLR6 reconhecem lipídios, enquanto TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 reconhecem ácidos nucleicos. Vírus possuem vários estruturalmente diversos PAMPs, incluindo glicoproteínas de superfície, DNA, RNA. Estes nucleotídeos imunoestimulatórios podem estar presentes na partícula viral infectante ou pode ser produzido durante a replicação viral (MOGENSEN e PALUDAN, 2005).

Os receptores TLR que detectam a infecção viral inclui TLR3, os quais reconhece RNA fita dupla (dsRNA, constitui o genoma de uma classe de vírus, mas é também gerado durante o ciclo de vida de muitos vírus), TLR 7 ou 8 que reconhece RNA de fita simples (ssRNA) e TLR 9 que reconhece sequências de DNA contendo citosina e guanina (CpG) (FIELDS, 2005). Quanto a sua distribuição celular, certos TLRs (TLR1, 2, 4, 5, 6 e 10) são expressos na superfície das células e reconhecem principalmente produtos bacterianos únicos e não produzidos pelo hospedeiro, enquanto outros (TLR3, 7, 8 e 9) são localizados em compartimentos intracelulares, incluindo endossomos e lisossomos, e são especializados no reconhecimento de ácidos nucleicos (IWASAKI, 2004).

Embora os estudos das funções dos TLRs sejam mais avançados em ratos e humanos, uma série de TLRs tem sido identificados em outros vertebrados incluindo peixe, (OSHIUMI *et al.*, 2003; HIRONO *et al.*, 2004; JAULT *et al.*; 2004; MEIJER *et al.*, 2004), galinhas (tabela 1) (FUKUI *et al.*, 2001; LEVEQUE *et al.*, 2003) e bovinos (WERLING e JUNGI

2003). Em galinhas TLR2 e TLR4 foram identificados e caracterizados no nível molecular e funcional (BOYD *et al.*, 2001; FUKUI *et al.*, 2001; LEVEGUE *et al.* 2003). *Expressed Sequence Tags* (ESTs) de galinhas foram identificados com alta homologia a TLRs de mamíferos TLR1, 6, 10 e 3; e com homologia a muitos componentes das conhecidas vias de sinalização TLR (LYNN *et al.*, 2003), sugerindo que há uma considerável similaridade entre os sistemas TLRs de mamíferos e galinhas. A análise de diversos bancos de dados revelou a existência de EST de galinhas de maior sequência de homologia com TLRs humanos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 em concordância com achados de Lynn *et al.* (2003).

Tabela 1. Receptores Toll like de galinhas (adaptado de MUHAMMAD, et al;2005).

TLR	Outros nomes	Agonista	Patógeno
TLR1La	TLR1.1,TLR1/6/10,TLR16		
TLR1Lb	TLR1.2	Lipoproteína	Micoplasma
TLR2a	TLR2.1	Peptideoglicano	Bactéria gram +
TLR2b	TLR2.2		
TLR3		dsRNA	Vírus
TLR4		LPS	Bactéria gram -
TLR5		Flagelina	Bactéria gram -
TLR7		SsrRNA, Imiquimod	Vírus
TLR21		CpG ,DNA cromossômico	Bactérias e vírus

Em relação à expressão dos TLRs, MUHAMMAD *et al.*, 2005, ainda demonstraram que chTLR 3, 4 e 5 compartilham alguns aspectos da expressão tecidual em humanos, com algumas significantes diferenças no nível de expressão em diferentes tecidos; chTLR3 (de galinhas) apresenta um alto nível de expressão nas células do rim, fígado, pulmão, ceco, duodeno, jejuno, íleo e timo.

Células imunes que expressam TLR3 e contribuem para resposta imune inata são, macrófagos, células natural killer, células dendríticas. O exato papel do TLR em infecções virais ainda é controverso (EDELMAN *et al.*, 2004; TABETA *et al.*, 2004). Vários trabalhos evidenciaram que TLR3 contribuem para eliminação de vírus específicos, no entanto, outros demonstram que alguns vírus podem se beneficiar da estimulação TLR3. Mas parece que o resultado geral depende de vários fatores, tais como, tipo de vírus, carga viral, modo da infecção, tipo celular que é infectado e o estágio da infecção.

TLR3 tem sido evidenciado em infecções do trato respiratório, que constitutivamente expressam TLR3. Infecção por Influenza A “*upregulate*” a expressão pulmonar de TLR3 e causa

pneumonia aguda (GUILLOT *et al.*, 2005; LE GOFFIC *et al.*, 2006). Apesar da alta produção de vírus Influenza A nos pulmões de camundongos TLR3 deficientes em relação ao camundongo selvagem, os camundongos TLR3 deficientes tiveram uma vantagem de sobrevivência inesperada. Devido à ausência da via de sinalização inflamatória TLR3 mediada, camundongos infectados com Influenza A mostram níveis mais baixos de mediadores inflamatórios e baixo número de células T CD8+, que contribuem para remoção de células infectadas do pulmão do que camundongos não infectados. Estes achados demonstram que embora TLR3 modere a produção viral no pulmão, ele também contribui para os efeitos debilitantes de detrimento da resposta inflamatória do hospedeiro (LE GOFFIC *et al.*, 2006).

Vários estudos permitem concluir que TLR3 é um receptor de sinalização considerado “perigoso”, pois através da sua presença em células imunes e não imunes está também envolvido no controle do balanço entre tolerância e inflamação e de outro lado inflamação e doença (VERCAMMEN *et al.*, 2008). A interação de TLRs com individuais PAMPs induz a ativação de diferentes vias de sinalização. A transdução de sinal é inicialmente mediada por uma família de moléculas adaptadoras que pelo menos em parte determina a especificidade da resposta (O’NEILL, 2007). O recrutamento de uma ou várias moléculas adaptadoras para um dado TLR é seguida pela ativação de várias vias de transdução de sinal, via fosforilação, ubiquitinação, ou interação proteína-proteína, resultando na ativação de fatores de transcrição que regulam a expressão de genes envolvidos na inflamação e defesas antimicrobianas do hospedeiro (AKIRA, 2006).

Três principais vias de sinalização responsável por mediar resposta induzida por TLR incluem, NF- $\kappa$ B, proteínas kinases ativadoras de mitógenos (MAPKs) e fatores regulatórios de IFNs (IRFs). À medida que NF- $\kappa$ B e MAPKs desempenham função principal na indução da resposta inflamatória, IRFs são essenciais para estimulação da produção de IFN I (AKIRA, 2004; 2006; KAWAI, 2007).

O RNA de fita dupla (dsRNA) é um potente ativador de células da imunidade inata que induz a produção de IFN I. Em resposta a estimulação por poly IC, TLR3 recruta um domínio TIR contendo uma proteína adaptadora chamada TRIF, que indiretamente ativa vários fatores de transcrição, incluindo IRF3, NF- $\kappa$ B e AP-1. IRF3 controla a expressão de genes para INF I, enquanto NF- $\kappa$ B e AP-1 regula a expressão de genes que codificam citocinas inflamatórias (YAMAMOTO *et al.*, 2003; HOEBE *et al.*, 2003). TRIF recruta IKKs não canônicas, TBK1 (também conhecida como T2K ou NAK e IKKi (também conhecida como IKK $\epsilon$  para seu domínio N- terminal capacitando-os para fosforilar IRF3 (figura 2),

IRF3 fosforilado forma um dímero que transloca para o núcleo e induz a expressão de IFN  $\beta$  (YONEYAMA, 1998).

Da mesma forma que nos mamíferos em que TLR3 é um gene induzível de IFN, o mesmo é verdadeiro para galinhas, evento comprovado Philbin et al., (2005) que demonstraram que TLR3 de galinhas é um gene estimulador de IFN sendo facilmente induzido por IFN $\alpha$  e IFN  $\beta$ . Galinhas também respondem a dsRNA (PHILBIN *et al.*, 2005) e dependem do TLR3 (SCHWARZ *et al.*, 2007; KARPALA *et al.*, 2008). WANG et al., 2004, demonstrou que TLR3 é um importante componente da imunidade inata na defesa do hospedeiro contra IBV.

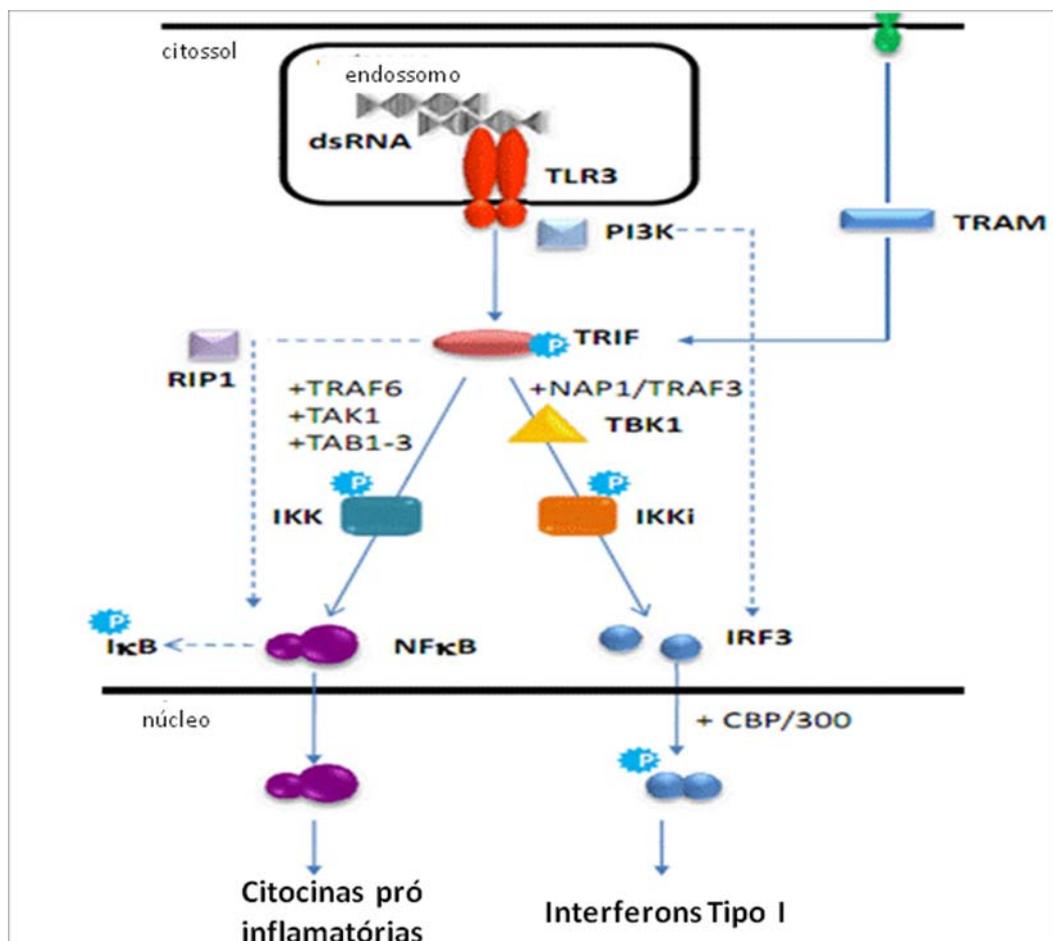


Figura 2. Via de sinalização TLR3. Fonte: DUNLEVY; MCELVANY; GREENE, 2010.

### 1.7 Interferons

As células desenvolveram diversos mecanismos de resposta antiviral inata e adquirida para combater a infecção viral (FLINT *et al.*, 2000). Desde a sua descoberta há 50 anos atrás por Isaacs e Lindemann, o sistema IFN tem sido reconhecido como crucial para defesa contra infecção

viral. (ISAACS e LINDEMANN, 1957). Um dos mais importantes mecanismos de resposta antiviral inata são a produção e secreção de Interferons e subsequente ativação parácrina de sinalização via receptores de IFN. O complexo IFN é uma família de glicoproteínas sintetizadas por células de diferentes origens. Há várias funções entre elas: inibidora da replicação viral, imunomoduladora, estimuladora de células NK e de monócitos e também função antigênica e antiproliferativa (HALLER et al., 2006).

Os interferons são glicoproteínas com peso molecular entre 15 e 21 Kd, são divididos em dois grupos: tipo I que inclui o IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  e são produzidos pelos leucócitos, células epiteliais e fibroblastos, e o IFN tipo II também denominado de IFN  $\gamma$  ou IFN imune. Ele é induzido por linfócitos T auxiliar Th1 CD4<sup>+</sup>, sendo produzido principalmente por quase todas as células TCD8<sup>+</sup> estimuladas por antígenos estranhos e células NK (TAKAOKA, et al 2006).

Interferons tipo I, IFN $\alpha$  e IFN $\beta$ , são proteínas compostas por 165 a 200 aminoácidos com formato helicoidal, constituídas por cinco alfa hélices (MITSUI e SENDA, 1997). Os receptores de interferons são elementos de extrema importância para o bom desenvolvimento das ações biológicas promovidas pelo IFN, modificações na ligação do IFN ao receptor podem ser limitantes no processo de ativação das ações antivirais. Os receptores dos IFN tipo I ( $\alpha$  e  $\beta$ ) são membros família classe II dos receptores de citocinas, são formados de duas subunidades compostas por cadeias polipeptídicas denominadas IFNAR-1 uma glicoproteína de 557 aminoácidos com 21 aminoácidos no seguimento transmembrana e 100 aminoácidos no domínio citoplasmático, e IFNAR-2, que existe em três formas distintas IFNAR-2a I(forma curta), IFNAR-2b (forma solúvel) e IFNAR-2c (forma longa) contendo 515 aminoácidos e age como principal receptor funcional para IFN (CHIEUX,1999; NOVICK *et al.*, 1994).

Os receptores de IFN são expressos amplamente na maioria das células do organismo (KIM et al.,1997). Os domínios transmembrânicos dos receptores de interferon não exibem atividade enzimática intrínseca, porém os domínios citoplasmáticos do IFNAR-1 se associam de forma não covalente com a enzima tirosina quinase (TYK), e o IFNAR-2 com *Janus Kinase* (JAK) (UZE et al.,1992, STARK et al.,1998). O domínio intracelular dos seus receptores está associado com tirosinas quinases específicas (Tyk-2) que, após interação com IFN I são fosforiladas em outras tirosinas quinases (proteínas da família Janus quinase): JAK1 e JAK2. A ligação do IFN I também resulta na fosforilação do receptor de IFN por proteínas STAT1 e STAT2. Essas STATs recrutadas para fosforilação do IFNAR-1 formam dois complexos denominados fator ativador de INF- $\alpha$  (AAF) e fator genético 3 estimulador de INF (ISGF3). Esses fatores são translocados para dentro do núcleo e unidos a sequências de DNA (figura 3)

chamadas GAS (sequência ativadora de  $\text{INF}\gamma$ ) e ISRE (elemento responsável pela estimulação de interferon), (HONDA *et al.*, 2006).

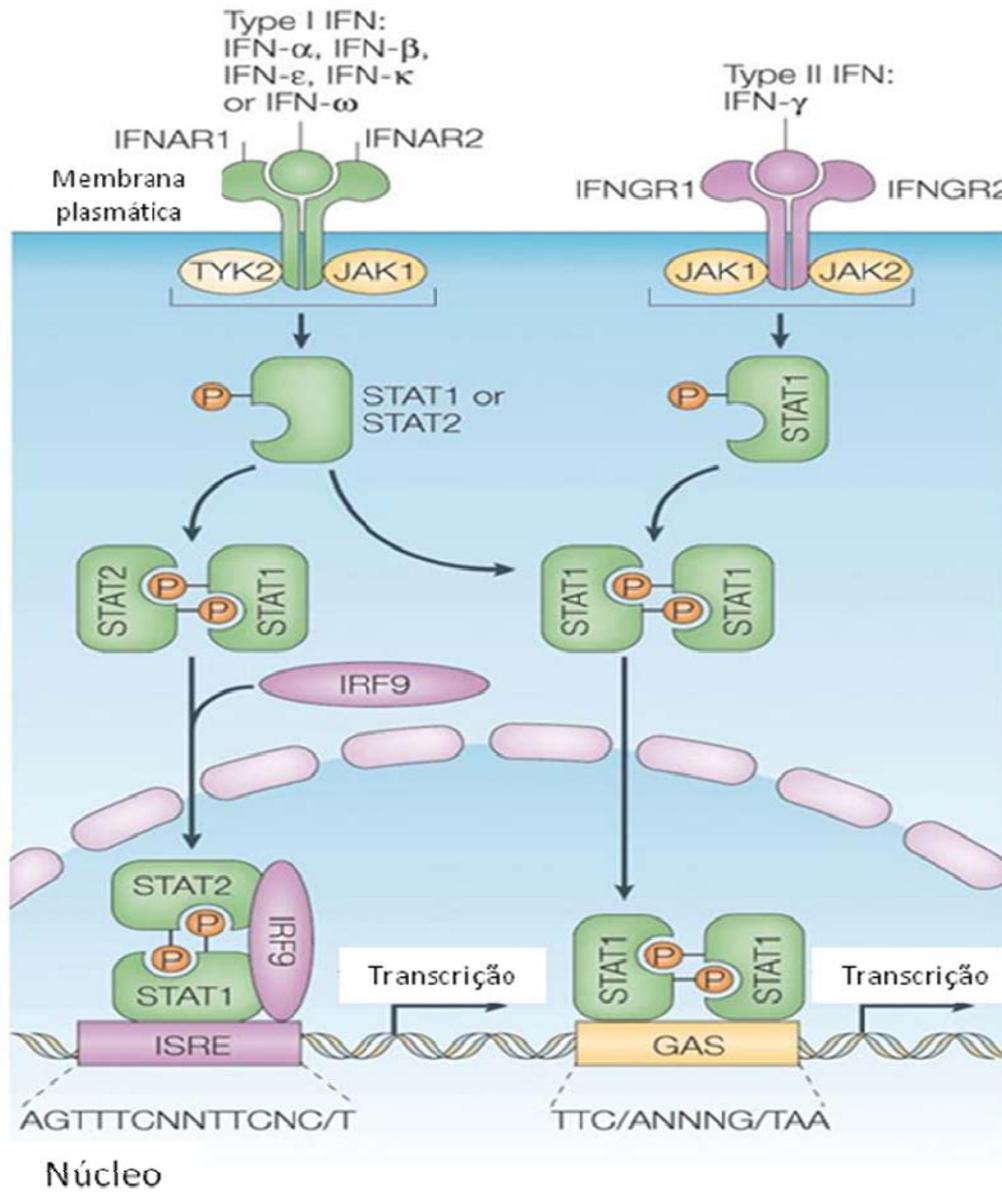


Figura 3. Via de sinalização dos IFN tipo I. Adaptado de: PETSCHAS.; KRAUSE.; WALTER, 2004.

Uma vez que as atividades biológicas dos interferons são iniciadas pela ligação dos IFN $\alpha$  e IFN- $\beta$  nos seus respectivos receptores presentes na superfície das células, o que resulta na

ativação da via de sinalização JAK/STAT induzindo a transcrição de um grande grupo de genes que empregam papel na resistência do hospedeiro, a infecção viral, assim como na ativação de componentes chaves do sistema imune inato e adaptativo incluindo células apresentadoras de antígenos (APCs), maturação e ativação de citocinas envolvidas na ativação de células T, B, e células Natural Killer (NK). Eles também ativam diretamente células dendríticas imaturas para regular o Complexo de Histocompatibilidade Maior I (MHC) e moléculas coestimulatórias CD40, CD80, CD86, que promove a apresentação de antígenos virais à órgãos linfoides secundários (THEOFILOPOULOS *et al.* 2005).

Conforme citado acima, a ligação do IFN I aos receptores desencadeia a atividade de duas quinases associadas a estes receptores JAK1 e TYK2. Estas quinases fosforilam as proteínas STAT que forma o complexo com outra proteína IRF-9. Este complexo designado por ISGF3 entra no núcleo e liga-se a sequências específicas (Interferon Stimulated Response Element, ISRE) na região promotora de múltiplos genes. Centenas de genes são expressos em resposta a ativação de STAT por IFN I (STARK *et al.*, 1998; TANABE *et al.*, 2005).

Indução de IFN I por infecções virais é controlada a nível transcricional. Conhecem-se dez fatores reguladores do INF (Interferon regulating factors –IRF). IRF1 e IRF2 foram os primeiros a serem identificados pela sua capacidade de ativação e repressão da transcrição, respectivamente (PETSKA *et al.*, 2004). São extremamente importantes durante a infecção e são alvos de regulação pelo vírus. Alguns vírus como o herpes vírus humano 8, vírus relacionado com Sarcoma de Kaposi, codificam homólogos de IRF evadindo-se das defesas do hospedeiro (LEE *et al.*, 2010). Os IRF1, IRF3, IRF5 e IRF7 atuam na transdução de vias de sinalização viral. Em resposta a infecção estes fatores de transcrição são fosforilados e migram para o núcleo onde ativam ou reprimem a transcrição de IFN I ou dos genes regulados por IFN (FULD *et al.*, 2006).

O genes IFN I de galinhas (ChINF-I), foram clonados, sequenciados e expressos como proteínas (SEKELLICK *et al.*,1994; SCHULTZ *et al.*,1995). Similar ao INF I em humanos ChINF-I inibe replicação viral incluindo Vírus influenza (PORTNOY e MERIGAN,1971; SEKELLICK *et al.*,2000) vírus da doença de Newcastle (NDV) (MARCUS; VAN DER HEIDE; SEKELLICK,1999) vírus da estomatite vesicular (VSV) (SEKELLICK *et al.*, 2000). VBI também tem capacidade de induzir IFN I em cultura de células, ovos embrionados, cultura de órgão da traquéia de galinhas infectadas (HOLMES e DARBYSHIRE,1978; OTSUKI *et al.*,1979), sugerindo que a indução de IFN I pode ser um importante mecanismo da imunidade inata para este coronavírus.



## **II – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ABREU, J.T. et al. **Molecular analysis of brazilian infectious bronchitis field isolates by reverse transcription-polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism, and partial sequencing of the N Gene**. Avian Diseases, v.50, p.494-501, 2006.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. **Pathogen recognition and innate immunity**. Cell, v.124, p.783–801, 2006.

AKIRA, S., TAKEDA, K. **Toll-like receptor signalling**. Nat. Rev Immunol, v. 4, p.499–511, 2004.

BOYD, Y., GOODCHILD, M., MORROLL, S., BUMSTEAD, N. **Mapping of the chicken and mouse genes for toll-like receptor 2 (TLR2) to an evolutionarily conserved chromosomal segment**. Immunogenetics, v.52, p. 294–298, 2001.

BRENTANO, L., KLEIN, T.A.P., JAENISCH, F.R., BACK, A. e CASTRO, AG.M. **Isolamento do vírus de bronquite infecciosa das aves de surtos da doença associada a lesões “atípicas” de miopatia de músculo peitoral**. Suplemento 7, p 232. Simpósio Sobre Sanidade Avícola, FACTA (Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola), São Paulo-SP, 2005.

BRENTANO, L., ESTEVES, P.A., TREVISOL, I.M., HAYASHI, M.M., LUCIANO, R.L., CASTRO, AG. M, KLEIN, T.A.P., MOLINARI, M. **Sequenciamento parcial do gene S1 de vírus da bronquite infecciosa (IBV) isolados de surtos da doença associada a lesões de miopatia peitoral**. Suplemento 8, p 241. Simpósio Sobre Sanidade Avícola, FACTA (Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola), Santos-SP, 2006.

CASAI, R; DAVIES, M; CAVANAGH, D. BRITTON, P. **Gene 5 of the avian coronavirus infectious bronchitis virus is not essential for replication**. J Virol, v.79, p.8065-8078, 2005.

CAVANAGH, D.; BRIAN, D. A.; BRINTON, M. A. et al. **Revision of the taxonomy of the Coronavirus, Torovirus e Arterivirus genera.** Arch. Virol., v. 135, p. 227-237, 1994.

CAVANAGH, D.; BRIAN, D. A.; BRINTON, M. A. et al. Coronaviridae. In: MURPHY, F. A. et al., (Eds). *Virus Taxonomy (Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses)*. Vienna; NY: Springer-Verlag, 1995. p. 407-411.

CAVANAGH, D. **Coronaviruse in poultry and others birds.** Avian Pathol. v.34, p.439-448, 2005.

CAVANAGH, D. **Coronavirus avian infectious bronchitis virus.** Vet Res, v.38, p.281-297, 2007.

CAVANAGH, D; GELB JR, J. **Infectious bronchitis. In: SAIF, Y.M. et al. Diseases of Poultry**, 12. ed. Ames, IA, USA, pp. 117–135, 2008.

CAVANAGH, D; NAQI, S. **Infectious bronchitis. In: SAIF, Y.M. et al. Diseases of Poultry**. 11. ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press. pp 101–119,2003.

CAVANAGH, D.; NAQI, S. **Infectious Bronchitis. In: BARNES, H.J. et al. Diseases of poultry**.11. ed. Ames: Iowa State University Press, p.101-119, 2003.

CHIEUX V., HOBER D., CHEHADEH W., WATTR P. **Anti-viral proteins: from interferon alpha to its receptor.** Ann. Biol. Clin., Paris, v. 57, p. 283-290, 1999.

COOK, J. **Bronquite infecciosa aviária: situação mundial e distribuição de sorotipos.** Anais, p 13-27. Simpósio Sobre Sanidade Avícola, FACTA (Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola), São Paulo-SP, 1997.

Di FABIO, ROSSINI, L.I, ORBELL, S.J., PAUL, G., HUGGINS, M.B., MALO, A, SILVA, B.G.M. e COOK, J.K.A. **Characterization of infectious bronchitis viruses isolated from outbreaks of disease in comercila flocks in Brazil.** Avian Diseases. V44, p.582-589, 2003.

EDELMANN, K. H., S. RICHARDSON-BURNS, L., ALEXOPOULOU, K. L. TYLER, R. A., FLAVELL, and M. B. Oldstone. **Does Toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections?** *Virology*, v. 322, p.231–238, 2004.

FARSANG, A; ROS, C; RENSTROM, L.H; BAULE, C; SOOS, T; BELAK, S. **Molecular epizootiology of infectious bronchitis virus in Sweden indicating the involvement of a vaccine strain.** *Avian Pathol*, v.31, p.229-236, 2002.

Fields Virology. Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B & Straus SE (eds). Fifth edition. Lippincott-Raven, 2005.

FLINT , M.; McKEATING, J.A . **The role of hepatitis C glycoproteins in infection.** *Reviews in medical virology*, v.10, p.101-117, 2000.

FUKUI, A., INOUE, N., MATSUMOTO, M., NOMURA, M., YAMADA, K., MATSUDA, Y., TOYOSHIMA, K., SEYA, T. **Molecular cloning and functional characterization of chicken toll-like receptors. A single chicken toll covers multiple molecular patterns.** *J. Biol.Chem*, v.276, p.47143–47149, 2001.

FULD, S.; CUNNIGHAN, C.; KLUCHER, K.; DAVISON, A. J.; BLACKBOURN, D. J. **Inhibition of interferon signaling by the Kaposi's sarcoma associated herpesvirus full-length viral interferon regulatory factor 2 protein.** *J. Virol*, v.80, p.3092-3097, 2006.

GELB, Jr. J., WOLFF, J. B., MORAN, C.A. **Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens.** *Avian Dis.* v.35, p.82-87, 1991.

GUILLOT, L., R. LE GOFFIC, R.S.; BLOCH, N.; ESCRIOU, S; AKIRA, M. C.; SITAHAR, M. **Involvement of Toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus.** *J. Biol. Chem*, v.280, p.5571–5580, 2005.

HALLER, O.; KOCHS, G.; WEBER, F. **The interferon response circuit : induction and supression by pathogenic viruses.** *Virology*, v.344, p.119-130, 2006.

HIPÓLITO, O. **Isolamento e identificação do vírus da bronquite infecciosa das galinhas no Brasil.** Arq. Esc. Sup. Vet. V.10, p.131-63, 1957.

HIRONO, I., TAKAMI, M., MIYATA, M., MIYAZAKI, T., HAN, H.J., TAKANO, T., ENDO, M., AOKI, T. **Characterization of gene structure and expression of two toll-like receptors from Japanese flounder. *Paralichthys olivaceus*.** Immunogenetics, v.56, p.38–46, 2004.

HOEBE, K., DU, X., GEORGEL, P., JANSSEN, E., TABETA, K., KIM, S.O., GOODE, J., LIN, P., MANN, N., MUDD, S., CROZAT, K., SOVATH, S., HAN, J., BEUTLER, B. **Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88 independent TIR signalling.** Nature, v.424, p.743–748, 2003.

HOLMES, H.C., DARBYSHIRE, J.H. **Induction of chicken interferon by avian infectious bronchitis virus.** Res. Vet.Sci, v.25, p.178–181, 1978.

HONDA, K.; TAKAOKA, A.; TANGUCHI, T. **Type I interferon gene induction by the regulatory factor family of transcription factors.** Imunity, v.24, p.349-360, 2006.

IRITANI, Y; AOYAMA, S; TAKIGAMI, S; HAYASHI, Y; OGAWA, R; YANAGIDA, N; SAEKI, S; KAMOGAWA, K. **Antibody response to Newcastle disease virus (NDV) of recombinant fowlpox virus (FPV) expressing a hemagglutinin-neuraminidase of NDV into chickens in the presence of antibody to NDV or FPV.** Avian Dis, v.35, p.659-661, 1991.

ITO, N.M.K, MIYAJI, C.I, OKABAYASHI, S. **Controle de variantes do vírus da bronquite infecciosa das galinhas.** Simpósio Sobre Sanidade Avícola, FACTA (Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola), ANAIS, Palestras do temário geral, p.75-99. Santos-SP, 2006.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. **Toll-like receptor control of the adaptive immune responses.** Nat. Immunol, v.5, p.987–995, 2004.

JANEWAY, C.A, MEDZHITOV, R. **Innate Immune Recognition.** Annu.Rev.Immunol.v.20, P.197-216,2002.

JAULT, C., PICHON, L., CHLUBA, J. **Toll-like receptor gene family and TIR-domain adapters in *Danio rerio*.** Mol. Immunol, v.40, p.759–771, 2004.

JONES, R. C. **Viral respiratory diseases (ILT, aMPV infections, IB): are they ever under control?.** British Poul Sc, v.51:1, p.1 – 11, 2010.

HIPÓLITO, O., BOTTINO, J.A., PINTO, A.A. **Estudo de duas amostras de vírus isoladas de casos da síndrome nefrite-nefrose das galinhas no Brasil.**Ciência e Cultura, 25, 569. 1973.

KAISHO, T; AKIRA, S. **Toll-like receptors as adjuvant receptors.** Biochimica et Biophysica Acta, v.1589, p.1-13, 2002.

KARPALLA, A.J.; LOWENTHALA, A.B. **Activation of the TLR3 pathway regulates IFN $\beta$  production in chickens.** Developmental and Comparative Immunology,v.32,p.435-444,2008.

KAWAI, T., AKIRA. A. **Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors.** Trends Mol. Med, v.13, p.460–469, 2007.

KIMMEL, P. L; et al. **Brief report: idiotypic IgA nephropathy in patients with human immunodeficiency virus infection.** J. Med, v.327, p.702-706, 1992

KUSTERS, J.G., NIESTERS, H., LENSTRA, J.A, HORZINEK, M.C, ZEIJST VAN DER, B.A.M. **Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV.**Virology. v.169, p. 217-221, 1989.

KIM S.H., COHEN B., NOVICK D., RUBINSTEIN M. **Mammalian type I interferon receptors consists of two subunits: IFN $\alpha$ R1 and IFN $\alpha$ R2.** Gene, v. 196, p. 279-286, 1997.

LAI, M.M. **Genetic recombination in RNA viruses.** Curr. Top. Microbiol. Immunol. V.176, p,21-32, 1992.

LAMAS DA SILVA, J.M., HWANG, M.H. e CESARO, A.J. **Aspectos clínicos e anatomo-patológicos da síndrome nefrite-nefrose (SNN) em frangos de corte.** ANAIS do VI Congresso Brasileiro de Avicultura – Belo Horizonte, M.G., III: 414-422, 1979.

LEE, H.; LEE, S.; CHAUDHARY, P.M.; GILL, P.; JUNG, U.J. **Immune evasion by Kaposi's sarcoma associated herpesvirus.** Future Microbiology, v.5, p.1349-1365, 2010.

LEE, C.W.; BROWN, C.; HILT, D.A.; JACKWOOD, M.W. **Nephropatogenesis of Chickens Experimentally Infected with Various Strains of Infectious Bronchitis Virus.** J. Vet. Med. Sci, v. 66(7), p. 835-840,2004.

LEVEQUE, G., FORGETTA, V., MORROLL, S., SMITH, A.L., BUMSTEAD, N. BARROW, P., LOREDO-OSTI, J.C., MORGAN, K., MALO, D. **Allelic variation in TLR4 is linked to susceptibility to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection in chickens.** Infect. Immun, v.71, p.1116–1124, 2003.

LE GOFFIC, R., Balloy, V.; Lagranderie, M. L.; Alexopoulou, N.; Escriou, R. Flavell, M. C.; Si-Tahar, M. **Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR)3 to influenza A virus-induced acute pneumonia.** PLoS Pathog, v.2, p.53, 2006.

LIU, S; ZHANG, X; WANG, Y; LI, C; HAN, Z; SHAO, Y. LI, H; KONG, X. **Molecular Characterization and Pathogenicity of Infectious Bronchitis Coronaviruses: Complicated Evolution and Epidemiology in China Caused by Cocirculation of Multiple Types of Infectious Bronchitis Coronaviruses.** Intervirology, v.52, p.223-234, 2009.

LYNN, D.J., LLOYD, A.T., O'FARRELLY, C. **In silico identification of components of the Toll-like receptor (TLR) signaling pathway in clustered chicken expressed sequence tags (ESTs).** Vet.Immunol. Immunopathol, v.93, p.177–184, 2003.

MACHADO, P.R. L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E. M. **Mecanismos de resposta imune às infecções.** An bras Dermatol, v.79, p.647-664, 2004.

MARCUS, P.I., VAN DER HEIDE, L., and SEKELLICK, M.J. **Interferon action on avian viruses. I. Oral administration of chicken interferon- $\alpha$  ameliorates Newcastle disease.** J. Interferon Cytokine Res, v.19, p.881–885, 1999.

MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C.A. **A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.** Nature, v.388, p.394–397, 1998.

MEIJER, A.H., GABBY KRENS, S.F., MEDINA RODRIGUEZ, I.A., He, S.,BITTER, W., EWA SNAAR-JAGALSKA, B., SPAINK, H.P. **Expression analysis of the Toll-like receptor and TIR domain adaptor families of zebrafish.** Mol. Immunol, v.40, p.773–783, 2004.

MENDONÇA, J.F.P; MARTINS, N.R.S; CARVALHO, L.B; MELO, C.B. **Infectious bronchitis of chickens: current knowledge, strains and vaccines in Brazil.** Ciência Rural, v.39, n.8, nov, 2009.

MIKKO, H; MIKA, R; ALLAN, E. **Toll-like Receptors as Sensors of Pathogens.** Pediatric Research, v.50, n°3, 2001.

MITSUI, Y.; SENDA, T. **Elucidacion of the basic three dimensional structure of type I interferons and its functional and evolutionary implications.** J. Interferon Cytokine Res, v.17,p.319-326,1997.

MOGENSEN, T. H.; PALUDAN, S.R. **Reading the viral signature by Toll-like receptors and other pattern recognition receptors.** J. Mol. Med, v.83, p.180–192, 2005.

MONTASSIER, M.F.S. **Diversidade genética de amostras brasileiras do vírus da bronquite infecciosa determinada pelo sequenciamento de nucleotídeos dos genes N e S1.** 2008.105 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MUHAMMAD, I.; PHILBIN V.J.; Adrian L. SMITH, A.L. **Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines.** Veterinary Immunology and Immunopathology, v.104, p.117–127, 2005.

NITSCHKE, M.; WIEHL, S.; BAER, P.C.; KREFT, B. **Bactericidal activity of renal tubular cells. The putative role of human beta-defensins.** Exp Nephrol, v. 10, p.332–337, 2002.

NOVICK D., COHEN B., Rubinstein M. **The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning.** Cell, v.77, p. 39-40,1994.

OIE - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em 21 de outubro de 2011.

O'NEILL, L. A., BOWIE, A. G. **The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling.** Nat. Rev. Immunol,v.7,p.353–364,2007.

OSHIUMI, H., TSUJITA, T., SHIDA, K., MATSUMOTO, M., IKEO, K., SEYA ,T. **Prediction of the prototype of the human Toll-like receptor gene family from the pufferfish, Fugu rubripes, genome.** Immunogenetics, v.54, p 791–800, 2003.

OTSUKI, K., MAEDA, J., YAMAMOTO, H., TSUBOKURA, M. **Studies on avian infectious bronchitis virus (IBV) III. Interferon induction by and sensitivity to interferon of IBV.** Arch.Virol, v.60, p.249–255, 1979.

PEREIRA, N.A., ALESSI, A.C., OKINO, C.H., MONTASSIER, M.F.S., SANTOS, I.L., MONTASSIER, H.J., RICHTZENHAIN L.J. **Uma nova estirpe brasileira do vírus da bronquite infecciosa causadora de lesões gonadais e a proteção cruzada induzida pela vacina comercial atenuada.** *Biológico*. V.68, p.250-254, 2006.

PETSKA, S.; KRAUSE, C.D.; WALTER, M. R. **Interferons, Interferons like citokine and their receptors.** Immunol Rev, v.202: p.8-32,2004.

PHILBIN, V.J., IQBAL, M., BOYD, Y., GOODCHILD, M.J., BEAL, R.K., BUMSTEAD, N., YOUNG, J., SMITH, A.L. **Identification and characterization of a functional, alternatively spliced toll-like receptor 7 (TLR7) and genomic disruption of TLR8 in chickens.** *Immunology* v. 114, p.507–521, 2005.

PORTNOY, J., and MERIGAN, T.C. **The effect of interferon and interferon inducers on avian influenza.** *J. Infect. Dis.* v.124, p.545–552, 1971.

RAVETCH, J. **In vivo veritas: the surprising roles of Fc receptors in immunity.** *Nature Immunol.* v.11, p.183-185, 2010.

ROCK, F.L., HARDIMAN, G., TIMANS, J.C., KASTELEIN, R.A., BAZAN, J.F. **A family of human receptors structurally related to Drosophila toll.** *Proc Natl Acad Sci USA*, v.95, p.588–93, 1998.

ROUSE, B.T; SEHRAWAT, S. **Immunity and immunopathology to what decides the outcome?** v.10, 2010.

SANDRI, T.L. **Vírus da Bronquite infecciosa das galinhas (IBV) :distribuição, diversidade molecular e genealogia a partir de amostras de múltiplos órgãos de diversos tipos de criação do plantel avícola brasileiro.** 2009.80f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SCHALK A.F. HAWN M.C. **An apparently new respiratory disease of baby chicks.** *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.78, p. 413–422, 1931.

SCHULTZ, U., KASPERS, B., RINDERLE, C., SEKELICK, M.J., MARCUS, P.I., STAEHEL, P. **Recombinant chicken interferon: a potent antiviral agent that lacks intrinsic macrophage activating factor.** *Eur. J. Immunol.* v.25, p. 847–851, 1995.

SEKELICK, M.J., FERRANDINO, A.F., HOPKINS, D.A., MARCUS, P.I. **Chicken interferon gene: cloning, expression and analysis.** *J. Interferon Cytokine Res.* v.14, p.71–79, 1994.

SEKELLICK, M.J., CARRA, S.A., BOWMAN, A., HOPKINS, D.A., MARCUS, P.I. **Transient resistance of influenza virus to interferon action attributed to random multiple packaging and activity of NS genes.** J. Interferon Cytokine Res, v.20, p.963–970, 2000.

SILLER, W. G. & CUMMING, R. B. **The histopathology of an interstitial nephritis in the fowl produced experimentally with infectious bronchitis virus.** Journal of Pathology, v.114, p.163-173,1974

STARK G. R., KERR I. M., WILLIAMS B. R., SILVERMAN R. H., Schreiber R. D. **How cells respond to interferons.** Annu Rev Biochem, v.67, .227-264, 1998.

SZABO, G.; DOLGANIUC, A. **HCV immunopathogenesis :virus-induced strategies against host immunity .** Clin. Liver Dis, v.10, p.753 -771, 2006.

TABETA, K. P., GEORGEL, E., JANSSEN, X. Du, K., HOEBE, K., CROZAT, S., MUDD, L., SHAMEL, S., SOVATH, J., GOODE, L., ALEXOPOULOU, R. A., FLAVELL, and B. Beutler. **Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection.** Proc. Natl.Acad. Sci.v. 101, p. 3516–3521, 2004.

TAKAOKA A., YANAI H. **Interferon signaling network in innate defence.** Cellular Microbiology .v.8, p.907-922,2006.

TAKEUCHI, O; AKIRA, S. **Innate immunity to virus infection.** Immunological Reviews, v.227, p.75-86, 2009.

TANABE, Y.; NISHIBORI,T; SU, L.; ARDUINI ,R.M.; BAKER, D.P.; DAVID,M. **Cutting edge:role of STA1, STAT3 , and STAT5 in INF-alpha beta responses in T lymphocytes.** J Immunol, v.174, p.609 -613, 2005

THEOFILOPOULOS, A.N.; BACCALA, R.; BEUTLER, B. et al. **Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity.** Annu Rev Immunol, v. 23, p.307–336, 2005.  
TREVISOL, I.M. et all. **Teste de proteção vacinal para uma amostra de bronquite infecciosa isolada de caso de miopatia frente amostra de vacina comercial H120.**

Simpósio Sobre Sanidade Avícola, FACTA (Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola), São Paulo-SP, 2006.

UZE G., LUTFALLA G., BANDU, M. T., PROUDHON D., MOGENSEN, K.E. **Behaviour of a cloned murine interferon  $\alpha/b$  receptor expressed in homospecific or heterospecific background.** Proc Natl Acad. Sci. v, 89,p. 4774-4778, 1992.

VERCAMMEN, E.; STAAL, J.; BEYAERT, R. **Sensing of Viral Infection and Activation of Innate Immunity by Toll-Like Receptor 3.** CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, v.21, p. 13–25, 2008

VILLARREAL, L. Y. B. et al. **Orchitis in Roosters with Reduced Fertility Associated with Avian Infectious Bronchitis Virus and Avian Metapneumovirus Infections.** Avian Dis, v.51, p.900-904, 2007.

WANG, T., TOWN, T., ALEXOPOULOU, L., ANDERSON, J.F., FIKRIG, E., FLAVELL,R.A. **Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis.** Nat Med, v.10, p.1366–73, 2004.

WENTZ, I. **Bronquite infecciosa: que cepa vacinal usar?** In CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 4, 1992, Santos, SP. Anais da Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia. Santos: FACTA, 1992, 165-7. 1992.

WERLING, D., JUNGI, T.W. **TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response.** Vet. Immunol. Immunopathol, v.91, p.1–12, 2003.

YAMAMOTO, M., SATO, S., HEMMI, H., HOSHINO, K., KAISHO, T., SANJO, H., TAKEUCHI, O., SUGIYAMA, M., OKABE, M., TAKEDA, K., AKIRA, S. **Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway.** Science, v.301, p.640–643, 2003.

YONEYAMA, M., SUHARA, W., FUKUHARA, Y., FUKUDA, M., NISHIDA, E., FUJITA, T. **Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a**

**transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300.** *Embo J*, v.17, p.1087–1095, 1998.

YOUNT, B; ROBERTS, R.S; SIMS, A.C; DEMING, D; FRIEMAN, M.B, et al. **Severe acute respiratory syndrome coronavirus group-specific open reading frames encode nonessential functions for replication in cell cultures and mice.** *J Virol*, v.79, p.14909-14922, 2005.

## **III – OBJETIVOS**

---

### **3.1 OBJETIVO GERAL**

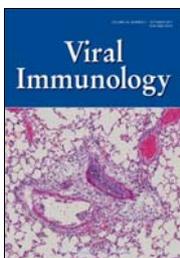
- Investigar o perfil de transcrição do IFN tipo I em aves infectadas com cepa clássica do vírus da Bronquite Infecciosa (VBI).

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Infectar as aves;
- Coletar o baço e a glândula de Harder das aves infectadas;
- Pesar os tecidos coletados;
- Extrair RNA do baço das aves;
- Quantificar o RNA extraído no espectrofotômetro;
- Correr géis de eletroforese;
- Sintetizar cDNA;
- Desenhar primers;
- Estudar a eficiência de amplificação dos genes estudados;
- Estudar a expressão de TLR3 do baço de aves infectadas com cepa clássica (M41) do VBI em diferentes horas após infecção;
- Estudar a expressão de IFN-alfa do baço de aves infectadas com cepa clássica (M41) do VBI em diferentes horas após infecção;
- Estudar a expressão de IFN-beta do baço de aves infectadas com cepa clássica (M41) do VBI em diferentes horas após infecção.

## **IV - ARTIGO**

---

**ARTIGO A SER SUBMETIDO AO JOURNAL VIRAL IMMUNOLOGY****Perfil de Transcrição do Interferon tipo I e TLR3 em galinhas infectadas com o Vírus da Bronquite Infecciosa das Aves**

SILVA, R.R<sup>1</sup>; BERTANI, G. R<sup>2</sup>.

**Abstract**

This work aimed to study the profile of transcription of genes involved in innate immunity, TLR3 and IFN I in chickens infected with classical strain (M41) of the Infectious Bronchitis Virus in chickens. The spleen tissue of birds infected and uninfected (control) were assessed for 6, 12, 24 and 96 hours post infection (hpi) for the difference in gene expression using the method for quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR). Chickens infected with the strain classical Infectious Bronchitis Virus (M41) present in the initial phase of infection (6, 12, 24 hpi) increased expression of IFN $\alpha$ , followed by removal of a signaling pathway TLR3 and no significant change in the expression of IFN $\beta$ .

---

1,2 Departamento de Bioquímica, Laboratório de Glicoproteínas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rêgo, s/n Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-420 Pernambuco, Brazil

## 1. Introdução

O Vírus da Bronquite infecciosa (VBI) é um coronavírus de galinhas (*Gallus gallus*), causa uma doença viral aguda e altamente contagiosa, causando grandes perdas econômicas á indústria avícola em todo o mundo, apesar das tentativas de controle por vacinação. (16,22). No Brasil, a BI (Bronquite Infecciosa) é uma doença endêmica, permanecendo como problema econômico importante para avicultura. Os surtos no país tem ocorrido com frequência e com a emergência de novas variantes do vírus (22).

O VBI das galinhas pertence ao gênero Coronavírus, família coronaviridae e ordem Nidovirales, sendo este o protótipo da família (22). São vírus envelopados, com 120 nm de diâmetro, seu genoma consiste de RNA de fita simples polaridade positiva de 28 a 32 kb que codifica quatro proteínas estruturais: Glicoproteína S (Spike), proteína do envelope (E), proteína de membrana (M) e a proteína N forma o nucleocapsídeo viral (16). Os coronavírus também codificam proteínas acessórias cujas funções são desconhecidas, mas sabe-se que não são requeridas para replicação *in vitro*,

porém podem estar envolvidas na patogênese (36).

Vírus da Bronquite Infecciosa é descrito com um patógeno de aves da espécie *Gallus Gallus* que replica primariamente no trato respiratório, mas também em células epiteliais de outros órgãos, dentre os quais o sistema digestivo, reprodutor e urinário das aves. (38,39).

Diferentemente dos estudos em mamíferos, ainda permanece uma carência de informações sobre a resposta imune antiviral em galinhas.

O reconhecimento do vírus é um evento chave que desencadeia a resposta antiviral do hospedeiro. Este reconhecimento é dependente de uma família de receptores de reconhecimento padrão conhecido como Receptores Toll like (TLRs) (3). Já foram identificados pelo menos 13 destes TLRs e ortólogos tem sido observado em uma variedade de espécies, incluindo galinhas e com homologia a muitos componentes das conhecidas vias de sinalização TLR (23), sugerindo que há uma considerável similaridade entre os sistemas TLRs de mamíferos e galinhas. Em mamíferos a resposta imune antiviral envolve TLR 3,7,8 e 9, todos os quais são considerados importantes no reconhecimento de ácido nucléico

viral (23), em aves, TLR3 está envolvido no reconhecimento viral. Estas moléculas incluem dsRNA que medeiam uma via antiviral mediada por TLR3 (29,30); WANG et al., 2006, demonstrou que TLR3 é um importante componente da imunidade inata na defesa do hospedeiro contra IBV (23).

Da mesma forma que nos mamíferos em que TLR3 é um gene induzível de INF, o mesmo é verdadeiro para galinhas, evento comprovado Philbin et al., (2005) que demonstrou que TLR3 de galinhas é um gene estimulador de INF sendo facilmente induzido por INF $\alpha$  e INF  $\beta$  (15).

Galinhas também respondem a dsRNA (15) e dependem do TLR3 (11,30). Vários estudos permitem concluir que TLR3 é um receptor de sinalização considerado “perigoso”, pois através da sua presença em células imunes e não imunes está também envolvido no controle do balanço entre tolerância e inflamação e de outro lado inflamação e doença (23).

Para estudar o papel do TLR3 e IFN I na resposta imune de galinhas, foi observada a expressão destes genes em galinhas infectadas com diferentes cepas virais em diferentes horas pós infecção.

## Materiais e Métodos

**Infecção Experimental das aves e coleta dos tecidos.**

Foram selecionados 48 galinhas da linhagem Leghorn SPF (specific pathogen free), da Embrapa Suínos e Aves –SC, com 26 dias de idade para o desafio com a cepa clássica do Vírus da Bronquite Infeciosa M41(Massachussetts 82828). A dose infectante por ave foi 10% em dose DIE 50%.

Dois grupos experimentais foram estudados: 1) grupo controle: aves infectadas com placebo (n=24) e 2) grupo M41:grupo infectado com a cepa clássica do VBI M41 (n=24). A inoculação do vírus ocorreu através da via intra-ocular. Em diferentes horas pós infecção (hpi), o baço e a glândula de harder foram coletados, pesados e armazenados em nitrogênio líquido. Foi considerado hpi zero no dia da inoculação onde os tecidos de 8 aves foram coletado antes da infecção. E posteriormente, foram coletados os tecidos em 6, 12, 24 e 96 horas pós infecção.

**Extração do RNA total das amostras de baço.**

O RNA total foi obtido a partir da extração com isotiocianato de guanidina, fenol, clorofórmio baseado no método de Chomczynsky & Sacchi, utilizando-se o reagente TRIZOL, seguindo-se as recomendações do fabricante.

#### Análise do RNA extraído

A integridade das amostras de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1,0% contendo formaldeído (Proquímicos) a 2,2M e tampão MOPS (Fluka) [MOPS a 20mM (pH 7,0) acetato de sódio a 8mM e EDTA a 1mM (pH 8,0)], preparado com água esterelizada tratada com DEPC (Sigma), segundo as recomendações Sambrook et al. Pipetou-se em tubos de microcentrífuga de 0,2mL, 3μL de RNA total, 1μL de MOPS 10X, 1,74μL de formaldeído a 40% e 5μL de formamida (Bio Basic Inc). A seguir, os tubos foram incubados por quinze minutos a 65 °C e imediatamente transferidos para um banho de gelo. Em seguida, foi acrescentado em cada tubo 2μL do tampão de amostra tratado com água DEPC [glicerol a 50%, azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol FF a 0,25% e EDTA (Grupo Química) a 1mM (pH 8,0)] e 1μL de brometo de etídio

(Amresco). As amostras foram então aplicadas no gel imerso em tampão MOPS (Fluka) 1X [MOPS a 20 Mm (pH 7,0), acetato de sódio (Vetec) a 8Mm e EDTA a 1Mm (pH 8,0)]. A separação eletroforética foi feita a 100W utilizando a fonte modelo EEL 300. As bandas no gel foi visualizada por meio da incidência de radiação ultravioleta em uma câmara escura equipada com um transluminador LPIX-HE (Loccus) e uma câmera digital acoplada a um microcomputador dotado de software (Lpix Image HE) de captura e análise de imagens em tempo real.

As amostras de RNA também foram submetidas à leitura espectrofotométrica em BioPhotometer Plus (Eppendorf) nos comprimentos de onda 260 a 280nm para a determinação da concentração de RNA total em cada amostra extraída e de uma estimativa do seu grau de pureza a partir da relação  $A_{260}/A_{280}$ . A concentração das amostras pode ser verificada através do seguinte cálculo:  $Concentração = A_{260} \times 40 \times FD$  (Fator de Diluição), em que,  $A_{260}$  é a absorvância a 260 nm, 40 é o coeficiente de extinção para RNA, FD é o fator de diluição da amostra. O preparo das amostras para quantificação procedeu-se da seguinte maneira: Branco: 10μL de PBS e amostra: 2μL da amostra + 98μL de PBS (1/10).

Transcrição Reversa – Síntese de cDNA .

Para obter-se o DNA complementar (cDNA) que serviria posteriormente como molde para amplificação pela reação em cadeia de polimerase (PCR), uma alíquota de equivalente a 5µg do RNA total foi utilizada na reação de transcrição reversa. A reação de transcrição reversa foi feita em um Termociclador Biorad My cycler (Biorad), seguindo o protocolo experimental recomendado pelo fabricante da enzima Improm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase (Promega): cDNAs foram sintetizados a partir de 5µg de RNA total de amostras de baço e 1µl de oligo dT primer e água livre de nucleases para um volume final de 5µl

Posteriormente adicionou-se a reação: 4µl de 5X reaction buffer, 1,2µl de MgCl<sub>2</sub> (1.5Mm), 0,5µl de inibidor de nuclease e 1µl da enzima Transcriptase reversa, completando a reação para um volume final de 20 µl. A reação foi inicialmente submetida à uma incubação por 70°C por cinco minutos, posteriormente a reação foi colocada à 4°C por cinco minutos, e em seguida a reação foi submetida à um novo aquecimento 42°C por 60 minutos, procedendo-se a

inativação da enzima à 70°C por 15 minutos.

Desenho e otimizações dos primers.

Os primers usados foram obtidos da literatura, GAPDH (LIU,2010), MRPS27,β actina (MARCHESIN,2008) TLR3 e IFNα (KARPALLA,2008), e o gene IFNβ foi desenhado baseado em alinhamentos feitos no programa computacional Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) usando sequências do banco público de dados, GeneBank. Na tabela 1, têm-se os genes utilizados para o qPCR.

Eficiência de Amplificação

Neste estudo, foi utilizado uma curva de diluição para determinar a eficiência de amplificação de cada gene. A eficiência de amplificação de cada gene foi determinada a partir de uma curva de diluição seriada de cDNA (POLL). A curva padrão foi feita a partir da média de 10 réplicas de cada concentração de cDNA. Com estes resultados foi construído um gráfico correlacionando C<sub>q</sub> (ciclo PCR) versus a concentração da diluição seriada, a partir da qual obteve-se uma curva de regressão linear para determinar o slope, que foi utilizado para calcular a

eficiência de amplificação usando a equação (1), determinada por Rasmussen (2001).

$$\text{Eficiência (E)} = [10^{(-1/\text{slope})}] \quad (1)$$

#### RT –PCR Quantitativa em tempo Real

Após a extração do RNA usando a metodologia de Trizol, purificação do RNA e síntese de cDNA, com os procedimentos descritos anteriormente, nós procedemos o estudo de expressão dos genes, TLR3, IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  por PCR em tempo Real, usando o marcador SYBR Green (Quantifast/Qiagen). Oito animais de cada hpi (6,12,24,96), foram avaliados individualmente para o nível de expressão de TLR3, IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  e três genes constitutivos foram usados para normalizar os dados.

A análise da expressão dos genes foi realizada utilizando-se o termociclador Applied Biosystems – Model real time – 7500). Cada reação foi preparada com 2 $\mu$ l de cDNA (5 $\mu$ g), 10 $\mu$ l do mix SYBR Green PCR (Quantifast/Qiagen) e 1 pmol de cada primer, forward e reverse, completando a reação com água para um volume final de 20 $\mu$ l. As condições da reação para todos os pares de primers foram: incubação de 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de 95°C por genes.

15 segundos e extensão 60°C por 30 segundos. Ao término da reação, a curva de melting foi determinada para cada gene entre as temperaturas 75°C a 95°C. Todo o experimento de PCR em tempo real incluiu duas amostras como controle negativo.

#### Análise dos dados e Análise estatística

Para análise dos dados do PCR em tempo real foi utilizado o método de quantificação relativa, método comparativo  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , para análise eficiente das mudanças relativas à expressão do gene de interesse e controle (Livak, 2001). O termo CT representa o ciclo da PCR em que o aumento da fluorescência acima do nível basal foi detectado. A mudança na quantidade de DNA detectada é calculada pelo método mencionado acima, onde  $\Delta\Delta CT = (CT \text{ gene alvo} - CT \text{ gene controle})$ . Como neste experimento Foi utilizado 3 genes controles a normalização dos dados foi feita a partir da média geométrica dos 3

#### Resultados e Discussão

## Extração do RNA total

Após obter o RNA total as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%, onde foi possível verificar a integridade do RNA pela presença de bandas estrutural de RNA ribossomal (28S, 18S, 5,8S).

## Especificidade dos primers e Eficiência de amplificação

As condições ótimas de amplificação de cada gene foi estabelecida e a especificidade da reação para cada primer foi verificada por temperatura de melting ( $T_m$ ) e por eletroforese em gel de agarose, onde nós observamos a presença de uma única banda correspondente ao tamanho esperado do produto de cada gene amplificado.

Análise da  $T_m$  para cada gene foi realizada pelo software do equipamento Thermocycler machine – Model real eficiência de amplificação em análise de expressão relativa.

## Normalização dos Dados

A normalização dos dados do RT-PCR quantitativo pelo uso de genes de referência é correntemente o método mais aceitável para corrigir possíveis variações

time -7500 (Applied Biosystems v.2.04). Esta análise permite verificar a qualidade da reação, ausência de contaminantes ou geração de produtos inespecíficos. A  $T_m$  avalia a dissociação da fita dupla de DNA com aumento da temperatura, e o produto presente na reação é considerado específico quando apenas um pico é gerado; a  $T_m$  é definida quando a curva atinge um platô.

Genes apresentaram eficiência entre 2,5 e 4,49. (tabela 2). De acordo com Meijerink et al; (2001) para uma RT-PCR ser considerada reproduzível, a amplificação deve ser próxima a 100% a cada ciclo da reação. O valor da eficiência deve ser aproximadamente 2, o que significa que o material genômico dobra a cada ciclo, correspondendo a 100% de eficiência.

De acordo com Bustin (2009) o método da curva de diluição trata-se de uma informação confiável e transparente para determinar a geradas durante a extração do RNA total, síntese do cDNA e quantificação. No presente estudo nós investigamos a estabilidade da expressão dos genes de referência: GAPDH, MRPS27 e  $\beta$  actina, e a normalização dos dados foi feita a partir da média geométrica destes três genes. Estes genes estão envolvidos em numerosos processos biológicos, por

exemplo, GAPDH está envolvido no metabolismo da glicose, MRPS27 na síntese da proteína mitocondrial e  $\beta$  actina está envolvido na motilidade, estrutura e integridade celular.

#### Análise da Expressão Relativa

Os Receptores Toll like são essenciais no reconhecimento de Padrões Moleculares Associados aos Patógenos, uma vez que estes receptores são induzidos ocorre à ativação de vias de sinalização intracelular (7). TLR3 reconhece dsRNA induzindo a transcrição de proteínas e citocinas envolvidas na resposta imune do hospedeiro, dentre os quais os IFN tipo I (32). Para saber se O TLR3 e IFN pode estar associado com a resposta à infecção ao Vírus da Bronquite Infecciosa das aves, foi investigado a expressão destas moléculas no baxo de aves infectadas com cepa clássica do VBI.

Galinhas inoculadas com M41 ou PBS (controle) em 6,12,24,96 horas pós infecção, respectivamente foram analisadas por qRT-PCR para expressão de mRNA de TLR3, IFN  $\alpha$  e IFN  $\beta$ . O que se observou durante o períodos analisados da infecção com a cepa clássica do VBI (M41), foi que no hpi 6 não houve aumento significativo na

expressão de TLR3, o que se evidenciou foi uma supressão de TLR3, uma vez que os níveis de expressão apresentaram-se mais baixos quando comparado o grupo controle, quanto ao IFN  $\beta$  este manteve os níveis basais similar ao grupo não infectado, já o IFN  $\alpha$  apresentou um aumento significativo na expressão logo nas primeiras seis horas pós infecção. Nos hpi 12 e 24 observou-se que, enquanto a expressão dos IFNs tendeu a uma diminuição, o TLR3 exibiu uma tendência de aumento de expressão. Nas 96 horas pós infecção, em-se um aumento significativo na expressão de todos os genes (figura 1,2, 3).

De uma maneira geral os vírus tem a capacidade de estimular a resposta IFN. Em mamíferos, TLR3 é o principal receptor de reconhecimento de dsRNA viral. O mesmo é atribuído a galinhas, onde um amplo perfil de expressão dos TLRs tem sido reportado em aves White Leghorn, inclusive TLR3; implicando seu potencial papel no reconhecimento do patógeno viral (8,11).

Estudos com células de galinhas HEK-29, que expressam chTLR3 respondem a poly (I:C), mas não a agonistas TLR7 ou TLR9, utilizando um repórter NFkB (27), confirmando assim que chTLR3 atua como um receptor

para agonistas TLR3. Corroborando a importante atuação dos receptores Toll like na resposta à infecção viral, Karpala demonstrou que frangos infectados com influenza aviária H5N1 resultou em marcado aumento de TLR3 e IFN $\beta$  nos tecidos do pulmão, baço e cérebro em 24 horas pós infecção (9). Diferentemente do que foi observado por Karpalla, 2008, os resultados obtidos aqui foram que galinhas infectadas com o Coronavírus VBI não estimulou um aumento da expressão de TLR3 e IFN $\beta$  nas primeiras 24 horas pós infecção.

Sien, 2004 em experimentos com macrófagos obteve que a expressão de TLR3 é estimulada por IFN $\alpha$ . Ambos Influenza Vírus e Sendai vírus infectam macrófagos e são conhecidos produzir Interferon tipo I. Sendai Vírus induz a ativação de altos níveis de expressão de IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  e TLR3 após pré-tratamento com IFN $\alpha$ , o mesmo foi observado em células infectadas com Influenza A; confirmando prévias observações que IFN $\alpha$  regula a expressão dos receptores Toll like em macrófagos. Neste estudo observou-se que nos momentos iniciais da infecção houve um aumento na expressão de IFN $\alpha$ , o que pode-se sugerir que a tendência de aumento na expressão de TLR3 nas 12 horas pós infecção seja devido ao estímulo do IFN $\alpha$ .

TLR3 pode mediar estimulação inata por dsRNA e é importante para indução de IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  (19), no entanto outros experimentos sugerem que a produção de IFN $\alpha$  em células dendríticas em resposta à dsRNA citosólico é TLR independente. De acordo com Diebold (2003), a produção de interferon possa requerer o reconhecimento de dsRNA por um receptor de reconhecimento padrão intracelular, Proteína quinase R, é uma quinase citosólica ativada por autofosforilação ou ligação a dsRNA. Embora PKR esteja envolvida primariamente em inibir a replicação viral tem sido evidenciado em resposta a IFN para alguns vírus. Estabelecendo que PKR pode participar da indução de altos níveis de IFN tipo I independente de TLR3 ou outros TLRs (6). A presença de vias alternativas que podem levar a indução de IFN tipo I poderia ser uma explicação para o fato de neste experimento as aves infectadas apresentarem altos níveis de IFN $\alpha$  nas primeiras 6 horas pós infecção; seguido de uma aparente repressão do TLR3 o que nos leva a pensar que a indução de IFN $\alpha$  em bronquite infecciosa das galinhas ocorra de forma independente da via de sinalização TLR3.

Além dos TLRs outras vias podem responder ao dsRNA, no entanto

não se sabe o exato papel dos TLRs ou das proteínas citosólicas RIG1 e Mda5 em detectar coronavírus, ainda que várias famílias de vírus codifiquem produtos que antagonizam a sinalização neste nível (10,34). Coronavírus podem também codificar proteínas que bloqueiam os sensores para RNA viral; embora o exato mecanismo não tenha sido elucidado é possível que o genoma viral seja sequestrado, possivelmente pela proteína N viral, de tal maneira que o RNA viral fique protegido das proteínas sensores do hospedeiro (8,10).

Vários patógenos neutralizam a resposta interferon e até mesmo outros componentes importantes do sistema IFN, isto ilustra o quão importante é este sistema para o controle de uma diversidade de organismos infecciosos. (5,9). Por isso, os vírus tem desenvolvido estratégias de escape da resposta IFN, que pode ser agrupada em duas categorias: supressão da indução de IFN (14,15) ou supressão da sinalização (24,27). De acordo com o evidenciado neste experimento pode-se sugerir que

algum mecanismo desenvolvido pelo vírus o faz escapar dos receptores de reconhecimento padrão, TLR3, porém vias alternativas que levam a indução de IFN tipo I parece se o mecanismo pelo qual o vírus induz a expressão de IFN $\alpha$ .

Estudos com outros coronavírus animais (MHV,VBI,TGEV) demonstraram que estes vírus falharam em induzir em induzir IFN tipo I em cultura de células(32).

Galinhas infectadas com a cepa clássica do Vírus da Bronquite Infecciosa (M41) apresentaram na fase inicial da infecção, primeiras 6,12 e 24 horas pós infecção, aumento na expressão de IFN $\alpha$ , seguido por uma supressão da via de sinalização TLR3 enquanto que os níveis de basais de IFN $\beta$  permaneceram inalterados.

Table 1 qRT-PCR primer and sequences. F(Forward) ,R (Reverse).

Gene	Primer	Sequence (5'-3')	pb	Acession no.
TLR3	F	GCAACACTTCATTGAATAGCCTTGAT	92	EF137861

	R	GCCAAACAGATTTCCAATTGCATGT		
<b>INF<math>\alpha</math></b>	F	GGACATGGCTCCCACACTAC		X92477
	R	TCCAGGATGGTGTCTGTTGAAG	74	
<b>INF<math>\beta</math></b>	F	ACAACCTCCTACAGCACAACAATA		NM_001024836.1
	R	ACGTGTCGGAAGCAGTCAC	82	
<b>GAPDH</b>	F	TGCCATCACAGCCACACAGAAG		AF047874.1
	R	ACTTTCCCCACAGCCTTAGCAG	123	
<b><math>\beta</math> - actina</b>	F	ATGAAGCCCAGAGCAAAAAGA		L08165.1
	R	CTCCTCAGGGGCTACTCTCA	134	
<b>MRPS27</b>	F	GCTTGTTCTTGCTCCCCTC		427216
	R	TAACCCTGACCACCCAATC	104	

Table 2. R-squared ( $R^2$ ) and efficiency of the genes studied

<b>Gene</b>	<b>Regression equation</b>	<b>Replicas</b>	<b><math>R^2</math></b>	<b>Efficiency</b>
<b>INF<math>\alpha</math></b>	$y = -2,032x + 21,84$	10	0,945	3,1
<b>INF<math>\beta</math></b>	$y = -2,065x + 26,84$	10	0,970	3,0
<b>TLR3</b>	$y = -1,842x + 27,67$	10	0,842	3,4
<b>GAPDH</b>	$y = -2,509x + 27,10$	10	0,9881	2,5
<b>MRPS27</b>	$y = -1,531x + 22,26$	10	0,953	4,4
<b><math>\beta</math> - actina</b>	$y = -1,994x + 23,14$	10	0,590	3,1

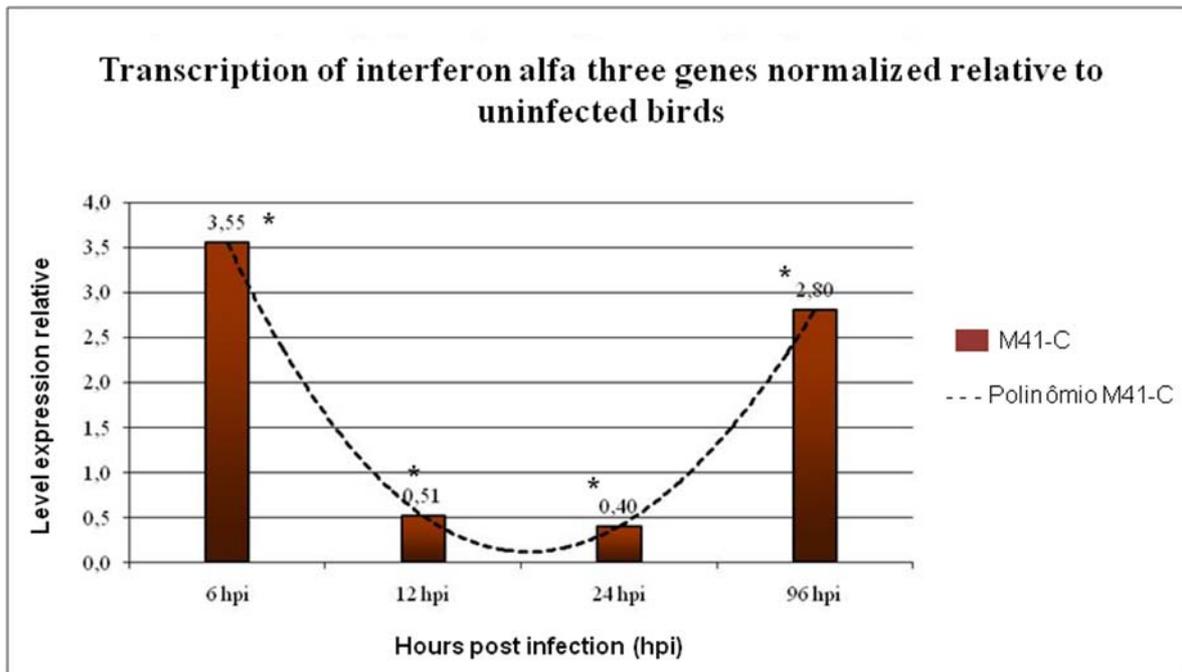


Figure1. Expression of the IFN alfa spleen of chickens infected with M41 and uninfected (control) at different times post infection (hpi). \*  $p < 0,05$ .

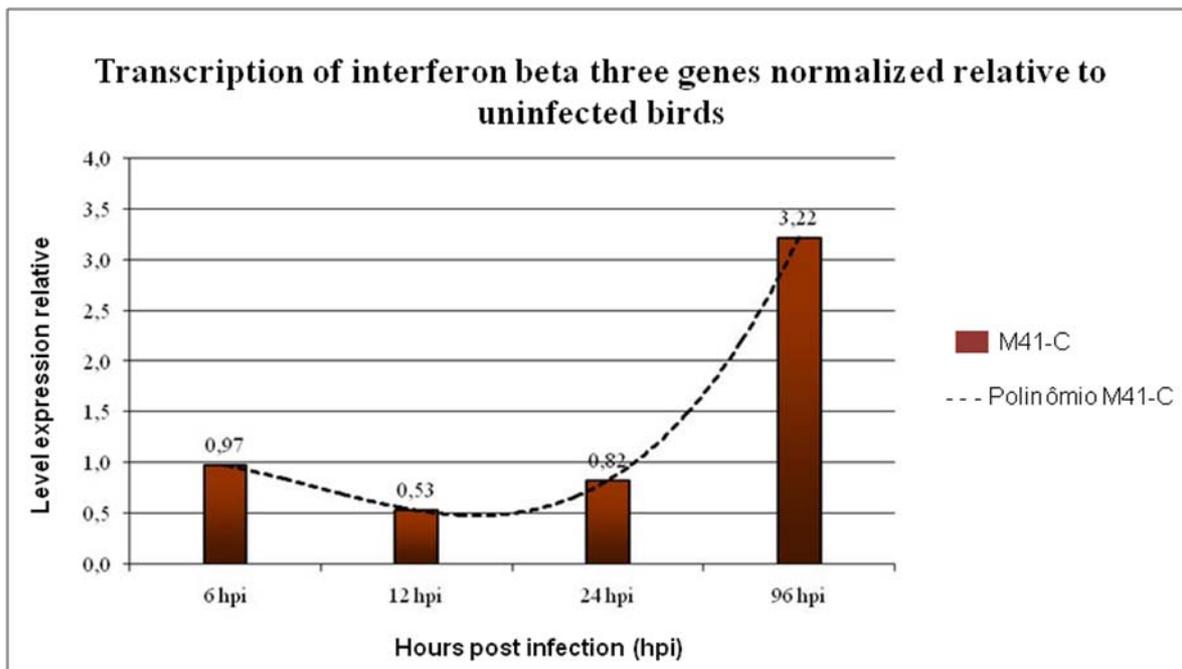


Figure 2. Expression of the IFN beta spleen of chickens infected with M41 and uninfected (control) at different times post infection (hpi).

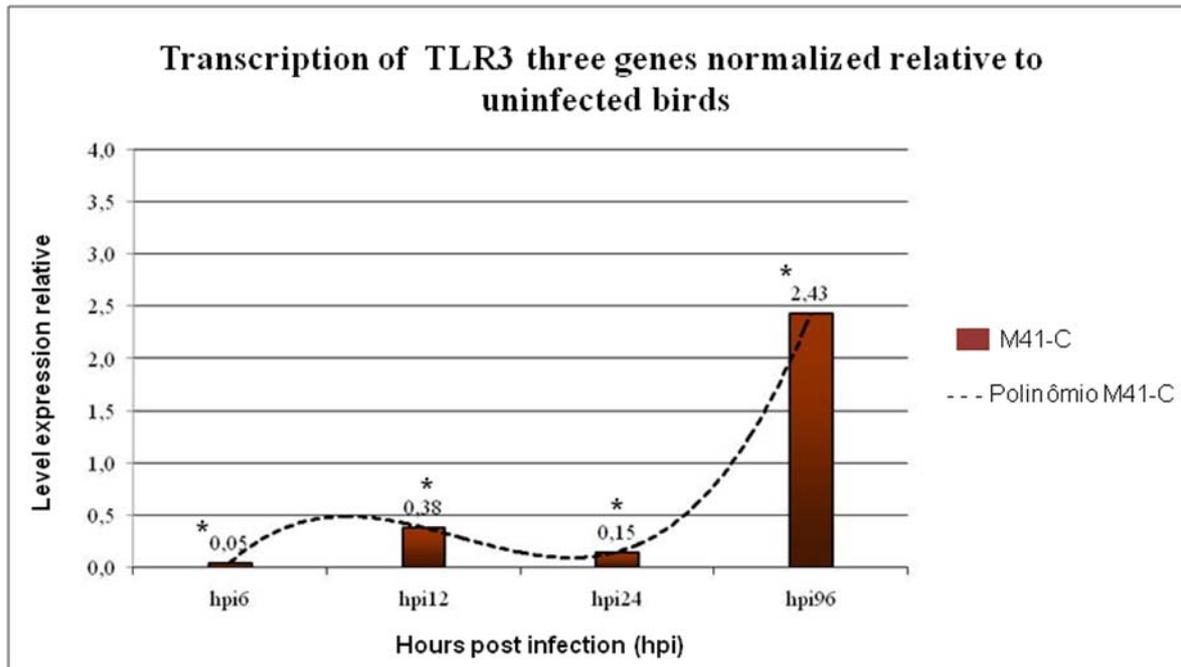


Figure 3. Expression of the TLR3 spleen of chickens infected with M41 and uninfected (control) at different times post infection (hpi). \*  $p < 0,05$ .

### Acknowledgements

The authors thank the Brazilian National Research Council (CNPq) and Embrapa (SC) for financial support.

### Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

### References

- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413:372-8.
- Bernasconi NL, Onai N, and Lanzavecchia A: A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood* 2003;101:4500–4504.
- Blasius A.L, Beutler B. Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity* 2010;32:305-311.
- Bustin, S.A. Why the need for qPCR publications guidelines? The case for MIQUE. *Methods*,v.50,p.217-226,2009.
- Cardenas, W.B., Loo, Y.M., Gale Jr., M., Hartman, A.L., Kimberlin, C.R.,Martinez-Sobrido, L., Saphire, E.O., Basler, C.F. Ebola virus VP35 protein binds double-stranded RNA and inhibits alpha/beta interferon production

- induced by RIG-I signaling. *J. Virol.* 2006, 80 (11), 5168–5178.
6. Diebold, S. S. et al. Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature*, v. 424, p. 324-328, 2003.
  7. Doyle SE, O'Connell R, Vaidya SA, Chow EK, Yee K, Cheng G. Toll-like receptor 3 mediates a more potent antiviral response than toll-like receptor 4. *J Immunol* 2003;170:3565-71.
  8. Hartman, A.L., Towner, J.S., Nichol, S.T., 2004. A C-terminal basic amino acid motif of Zaire ebolavirus VP35 is essential for type I interferon antagonism and displays high identity with the RNA-binding domain of another interferon antagonist, the NS1 protein of influenza A virus. *Virology* 328 (2),177–184.
  9. Hiscott, J., Lacoste, J., Lin, R. Recruitment of an interferon molecular signaling complex to the mitochondrial membrane: disruption by hepatitis C virus NS3-4A protease. *Biochem. Pharmacol.*
  10. Iqbal, M., V. J. Philbin, and A. L. Smith. Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines. *Vet. Immunol.Immunopathol* 2005; 104:117–127.
  11. Karpala AJ, Lowenthal JW, Bean AG. Activation of the TLR3 pathway regulates IFN $\beta$  production in chickens. *Dev Comp Immunol* 2008; 32:435–444.
  12. Kash, J.C., Muhlberger, E., Carter, V., Grosch, M., Perwitasari, O., Proll, S.C., Thomas, M.J., Weber, F., Klenk, H.D., Katze, M.G. Global suppression of the host antiviral response by Ebola- and Marburgviruses: increased antagonism of the type I interferon response is associated with enhanced virulence. 2006 *J. Virol.* 80 (6), 3009–3020.
  13. Kogut, M.H., Iqbal, M., He, H., Philbin, V., Kaiser, P., Smith, A., 2005. Expression and function of Toll-like receptors in chicken heterophils. *Development and comparative Immunology* 29, 791–807.
  14. Li, K., Foy, E., Ferreon, J.C., Nakamura, M., Ferreon, A.C., Ikeda, M., Ray, S.C., Gale Jr., M., Lemon, S.M. Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005a, 102 (8), 2992–2997.
  15. Lin, R., Lacoste, J., Nakhaei, P., Sun, Q., Yang, L., Paz, S., Wilkinson, P., Julkunen, I., Vitour, D., Meurs, E., Hiscott, J. Dissociation of a MAVS/IPS-1/VISA/Cardif-IKK $\epsilon$  molecular complex from the

- mitochondrial outer membrane by hepatitis C virus NS3-4A proteolytic cleavage. *J. Virol.* 2006. 80 (12), 6072–6083.
16. Liu S, Zhang X, Wang, LI C, Han Z, Shao Y, Li H, Kong X. **Molecular** Characterization and Pathogenicity of Infectious Bronchitis Coronaviruses: Complicated Evolution and Epidemiology in China Caused by Cocirculation of Multiple Types of Infectious Bronchitis Coronaviruses. *Intervirology* 2009;52:223-234.
  17. Livak, K.J.; Scmittgen, T.O. Analysis of relative gene expression data using real time PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 2001;25(4):402:8.
  18. Lynn D.J, Lloyd A.T, O'farrelly C. In silico identification of components of the Toll-like receptor (TLR) signaling pathway in clustered chicken expressed sequence tags (ESTs). *Vet.Immunol. Immunopathol* 2003; 93:177–184.
  19. Meijerink, J.; Mandigers, C.; Van de Locht, L.; Tonnissen, N.E.; Goodsaid, F.; Raemaerers, J.A. Novel method to compensate for different amplification efficiencies between patient DNA samples in quantitative real time PCR. *Journal of Molecular Diagnostics*, v.3, p.55-61, 2001.
  20. Mendonça J.F.P, Martins N.R.S, Carvalho L.B, Melo C.B. Infectious bronchitis of chickens: current knowledge, strains and vaccines in Brazil. *Ciência Rural* 2009; 39, n.8.
  21. Miettinen, M., T. Sareneva, I. Julkunen, and S. Matikainen. 2001. IFNs activate Toll-like receptor gene expression in viral infections. *Genes Immun.* 2:349.
  22. Montassier M.F.S. Diversidade genética de amostras brasileiras do vírus da bronquite infecciosa determinada pelo sequenciamento de nucleotídeos dos genes N e S1. 2008. 105 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
  23. Mogensen T. H, Paludan S.R. Reading the viral signature by Toll-like receptors and other pattern recognition receptors. *J. Mol. Med* 2005; 83:180–192.
  24. Parisien, J.P., Lau, J.F., Rodriguez, J.J., Sullivan, B.M., Moscona, A., Parks, G.D., Lamb, R.A., Horvath, C.M. The V protein of human parainfluenza virus 2 antagonizes type I interferon responses by destabilizing signal transducer and activator of transcription 2. *Virology*, 2001, 283 (2), 230–239.
  25. Philbin, V.J., Iqbal, M., Boyd, Y., Goodchild, M.J., Beal, R.K., Bumstead, N., Young, J., Smith, A.L. Identification and characterization of a functional, alternatively spliced toll-like

- receptor 7 (TLR7) and genomic disruption of TLR8 in chickens. *Immunology* 2005;114:507–521.
26. Rasmussen, R. Quantification in the LightCycler. In Meuer, S.; Witter, C.; Nakagawara, K. (Ed.). *Rapid Cycle Real time PCR, Methods and applications*. Heidelberg, Springer Press. 2001. p.21:34.
  27. Rodriguez, J.J., Parisien, J.P., Horvath, C.M. Nipah virus V protein evades alpha and gamma interferons by preventing STAT1 and STAT2 activation and nuclear accumulation. *J. Virol.* 2002, 76 (22), 11476–11483.
  28. Sirén, J et al. IFN- $\alpha$  regulates TLR-Dependent Gene Expression of IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-28, and IL-29. *J Immunol*, v.174, p.1932–1937, 2005.
  29. Sarkar SN, Smith HL, Rowe TM, Sen GC. Double-stranded RNA signaling by toll like receptor 3 requires specific tyrosine residues in its cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 2003; 278:4393–6.
  30. Schwarz, H., Schneider, K., Ohnemus, A., Lavric, M., Kothlow, S., Bauer, S., Kaspers, B., Staeheli, P. Chicken toll-like receptor 3 recognizes its cognate ligand when ectopically expressed in human cells. *J. Interferon Cytokine Res.* 2007; 27: 97–101.
  31. Siller, W. G. Renal pathology of the fowl - A review. *Avian Pathology*; 10: 187 – 262.
  32. Tang, B.S., Chan, K.H., Cheng, V.C., Woo, P.C., Lau, S.K., Lam, C.C., Chan, T.L., Wu, A.K., Hung, I.F., Leung, S.Y., Yuen, K.Y. Comparative host gene transcription by microarray analysis early after infection of the Huh7 cell line by severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus 229E. *J. Virol.*, 2005, 79 (10), 6180–6193.
  33. Vercammen E, Staal J, Beyaert R. Sensing of Viral Infection and Activation of Innate Immunity by Toll-Like Receptor 3. *Clinical Microbiology Reviews* 2008; 21:13–25.
  34. Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson J.F, Fikrig E, Flavell R.A. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* 2004; 10: 1366–73.
  35. Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., Akira, S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, v.301, p.640–643, 2003.
  36. Yount, B; Roberts, R.S; Sims, A.C; Deming, D; Frieman, M.B, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus group-specific open reading frames encode nonessential functions for

replication in cell cultures and mice. *J Virol*, v.79, p.14909-14922, 2005.

37. Zhou,Z.,Hoebe,K.,Du,X.,  
Jiang,Z.,  
Shamel,L.,Beutler,B.Antagonism  
betweenMyD88- andTRIF-  
dependent signals inB7RP-1 up-  
regulation.*Eur. J. Immunol.*2005,  
35 (6), 1918–1927.
38. Cavanagh, D. Coronavirus avian  
infectious bronchitis virus. *Vet  
Res*, v.38, p.281-297, 2007.
39. Cavanagh, D; Naqi, S. Infectious  
bronchitis. In: SAIF, Y.M. et al.  
*Diseases of Poultry*. 11. ed. Ames,  
Iowa: Iowa State University  
Press. pp 101–119,2003.

## V - CONCLUSÃO

---

- Galinhas infectadas com cepa clássica (M41) do vírus da Bronquite Infecciosa exibem um perfil de resposta imune inata envolvendo a indução imediata de Interferon alfa, em contrapartida a uma supressão da resposta TLR3.
- A resposta do Interferon beta não é eficaz nas fases iniciais da infecção com o vírus da Bronquite Infecciosa.

## **VI - ANEXOS**

---

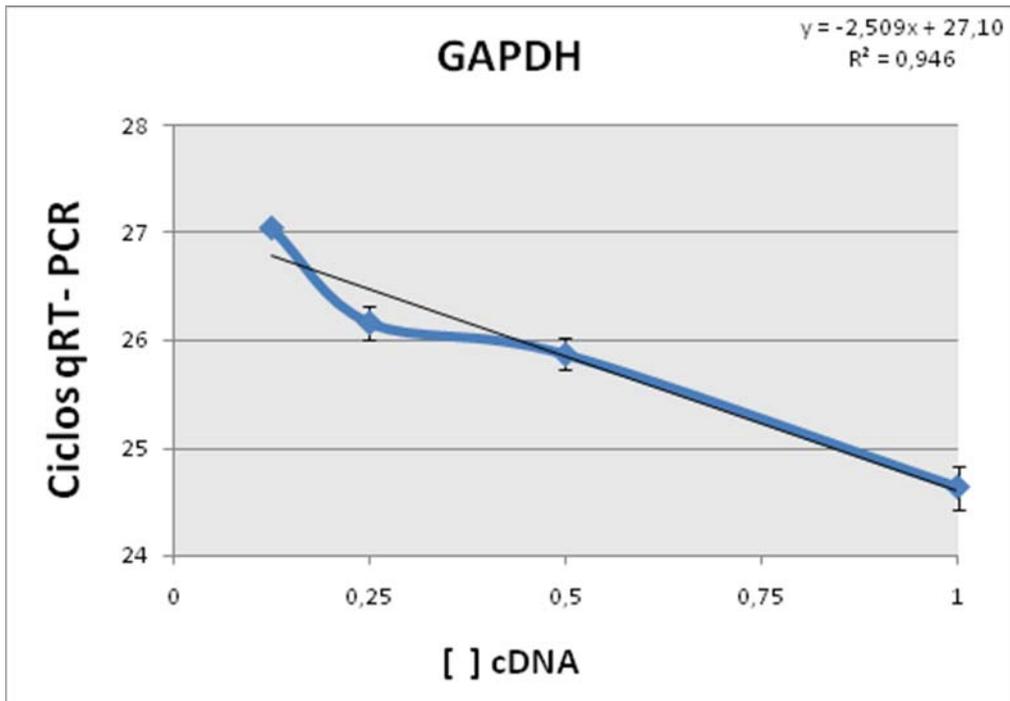


Figura 1. Eficiência GAPDH.

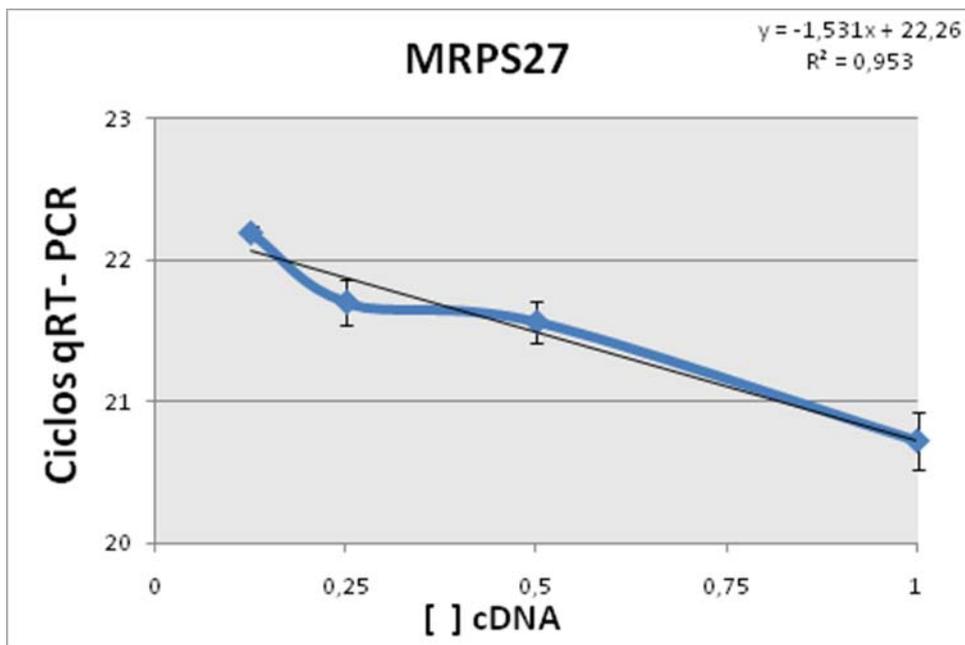


Figura 2. Eficiência MRPS27. EF = Eficiência

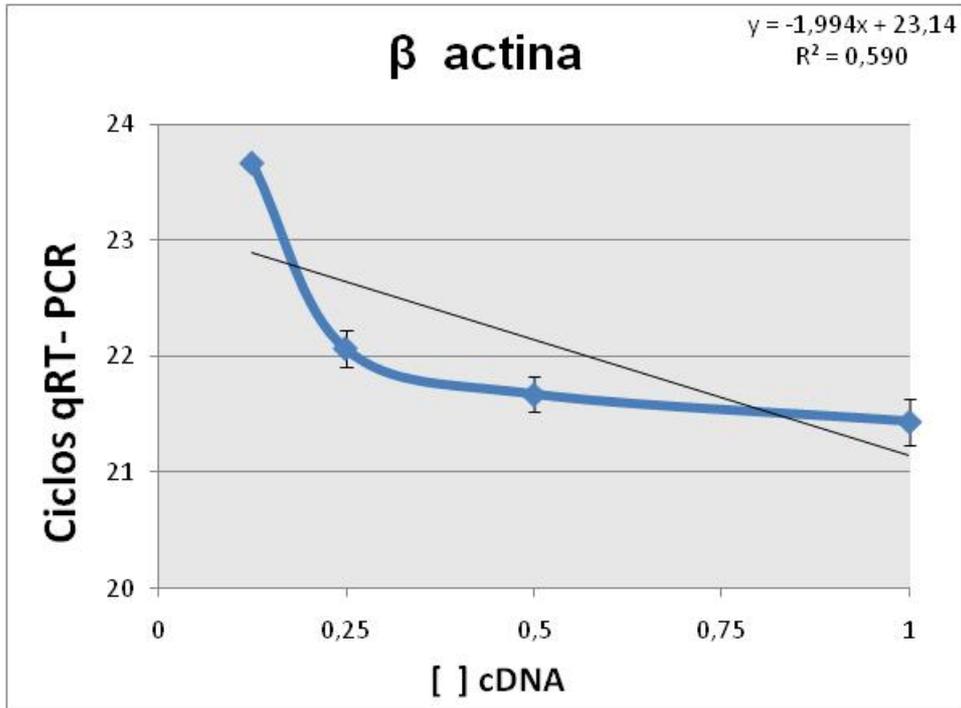


Figura 3. Eficiência Beta actina.

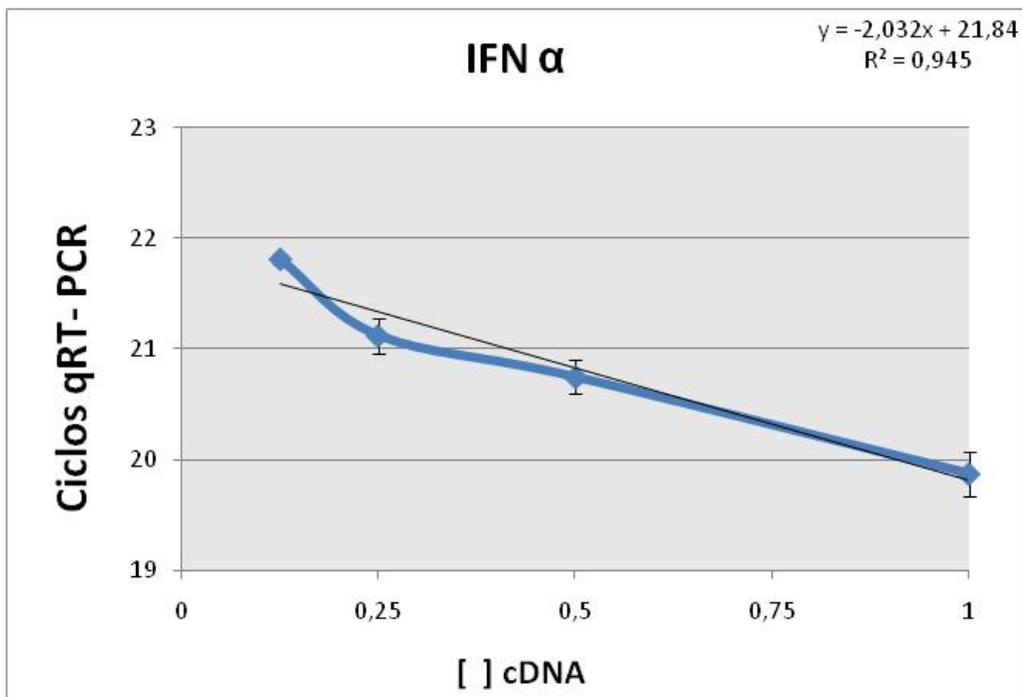


Figura 4. Eficiência Interferon alfa.

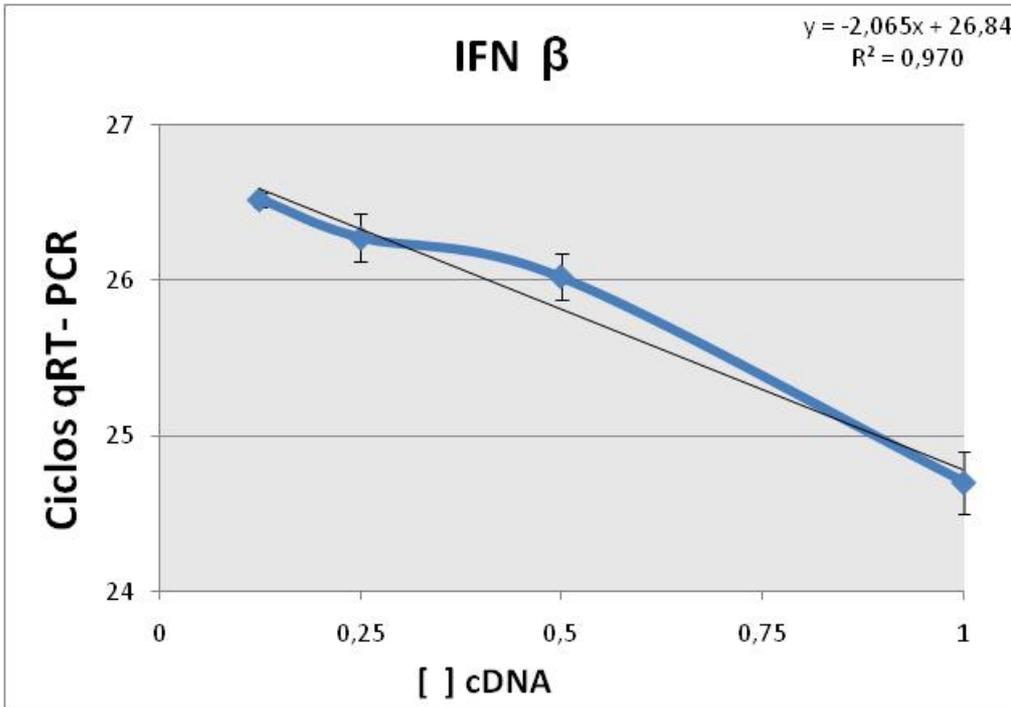


Figura 5. Eficiência Interferon beta.

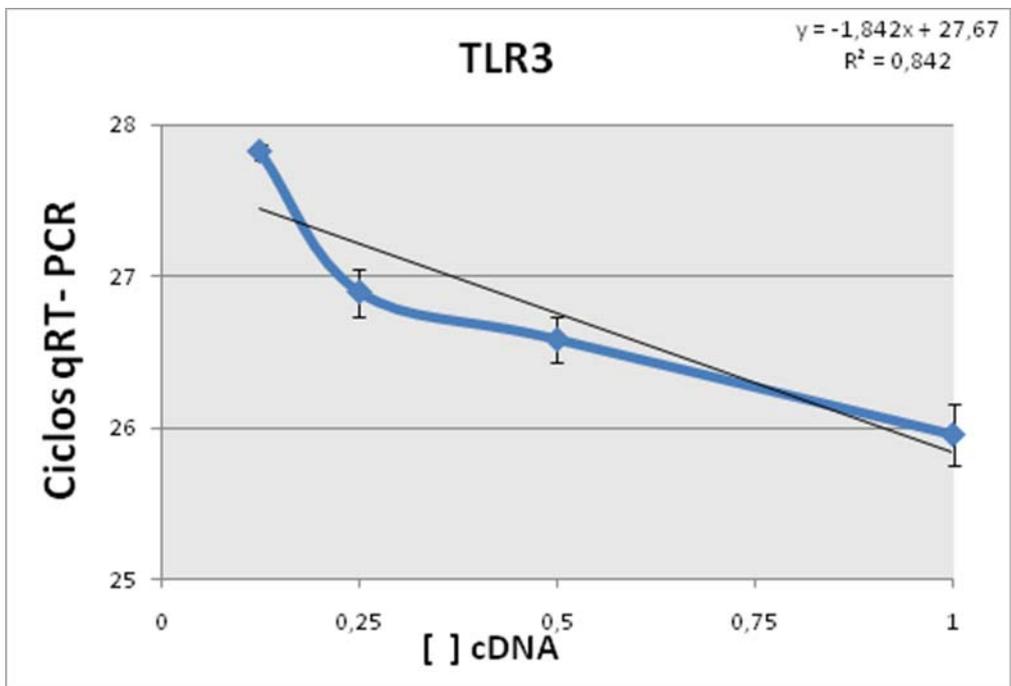


Figura 6. Eficiência do TLR3.

Tabela 1. Número de amplificações de qRT-PCR - GAPDH

Hpi	M41				CONTROLE			
	3R+	2R+	1R+	0R+	3R+	2R+	1R+	0R+
6h	8	0	0	0	8	0	0	0
12h	8	0	0	0	8	0	0	0
24h	8	0	0	0	7	0	0	0
96h	8	0	0	0	6	0	1	0

3R+ : Três réplicas de PCR em tempo real com resultado de amplificação Positivo. 2R+,1R+,0R+ , quando apenas duas, uma ou zero amplificação tiveram resultado positivo, respectivamente.

Tabela 2. Número de amplificações de qRT-PCR - MRPS27

Hpi	M41				CONTROLE			
	3R+	2R+	1R+	0R+	3R+	2R+	1R+	0R+
6h	8	0	0	0	8	0	0	0
12h	8	0	0	0	8	0	0	0
24h	8	0	0	0	7	0	0	0
96h	8	0	0	0	6	0	1	0

3R+ : Três réplicas de PCR em tempo real com resultado de amplificação Positivo. 2R+,1R+,0R+ , quando apenas duas, uma ou zero amplificação tiveram resultado positivo, respectivamente.

Tabela 3. Número de amplificações de qRT-PCR -  $\beta$  actina

Hpi	M41				CONTROLE			
	3R+	2R+	1R+	0R+	3R+	2R+	1R+	0R+
6h	8	0	0	0	8	0	0	0
12h	8	0	0	0	8	0	0	0
24h	8	0	0	0	7	0	0	0
96h	8	0	0	0	6	0	1	0

3R+ : Três réplicas de PCR em tempo real com resultado de amplificação Positivo. 2R+,1R+,0R+ , quando apenas duas, uma ou zero amplificação tiveram resultado positivo, respectivamente.

Tabela 4. Número de amplificações de qRT-PCR - TLR3

Hpi	M41				CONTROLE			
	3R+	2R+	1R+	0R+	3R+	2R+	1R+	0R+
6h	8	0	0	0	8	0	0	0
12h	8	0	0	0	8	0	0	0
24h	8	0	0	0	7	0	0	0
96h	8	0	0	0	6	0	1	0

3R+ : Três réplicas de PCR em tempo real com resultado de amplificação Positivo. 2R+,1R+,0R+ , quando apenas duas, uma ou zero amplificação tiveram resultado positivo, respectivamente.

Tabela 5. Número de amplificações de qRT-PCR - IFN  $\alpha$ 

Hpi	M41				CONTROLE			
	3R+	2R+	1R+	0R+	3R+	2R+	1R+	0R+
6h	8	0	0	0	8	0	0	0
12h	8	0	0	0	8	0	0	0
24h	8	0	0	0	7	0	0	0
96h	8	0	0	0	6	0	1	0

3R+ : Três réplicas de PCR em tempo real com resultado de amplificação Positivo. 2R+,1R+,0R+ , quando apenas duas, uma ou zero amplificação tiveram resultado positivo, respectivamente.

Tabela 6. Número de amplificações de qRT-PCR - IFN  $\beta$ 

Hpi	M41				CONTROLE			
	3R+	2R+	1R+	0R+	3R+	2R+	1R+	0R+
6h	8	0	0	0	8	0	0	0
12h	8	0	0	0	8	0	0	0
24h	8	0	0	0	7	0	0	0
96h	8	0	0	0	6	0	1	0

3R+ : Três réplicas de PCR em tempo real com resultado de amplificação Positivo. 2R+,1R+,0R+ , quando apenas duas, uma ou zero amplificação tiveram resultado positivo, respectivamente.

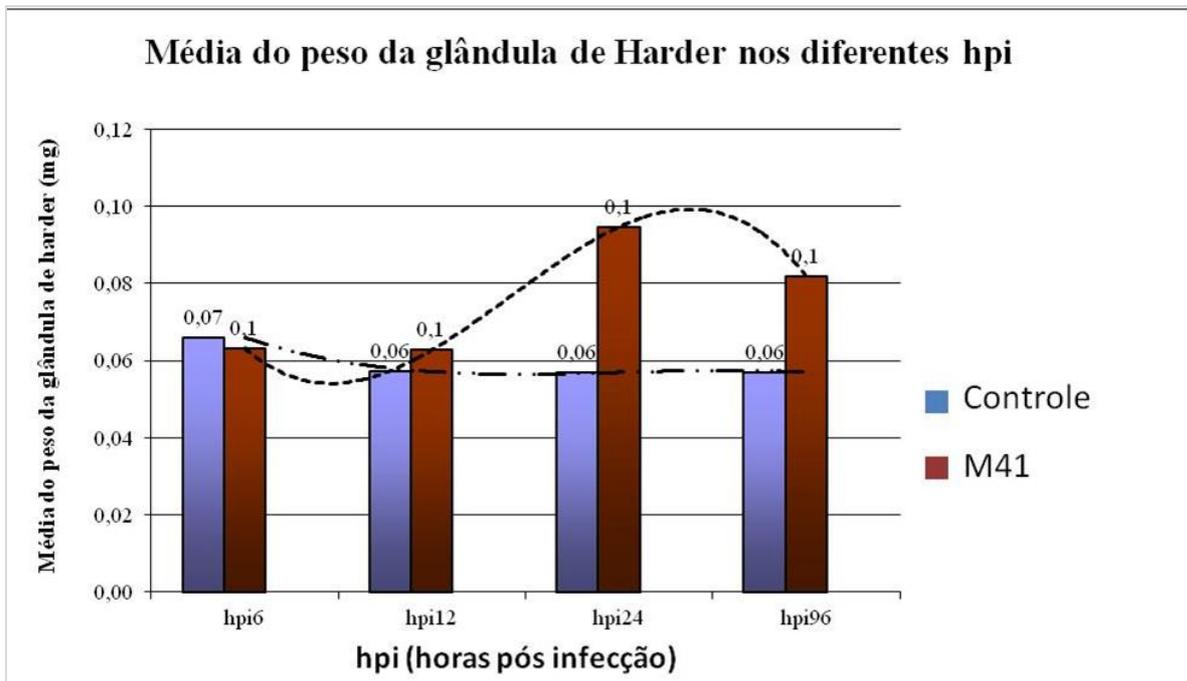


Figura 7. Relação do peso da glândula de Harder das aves controles e infectadas em diferentes horas pós infecção.

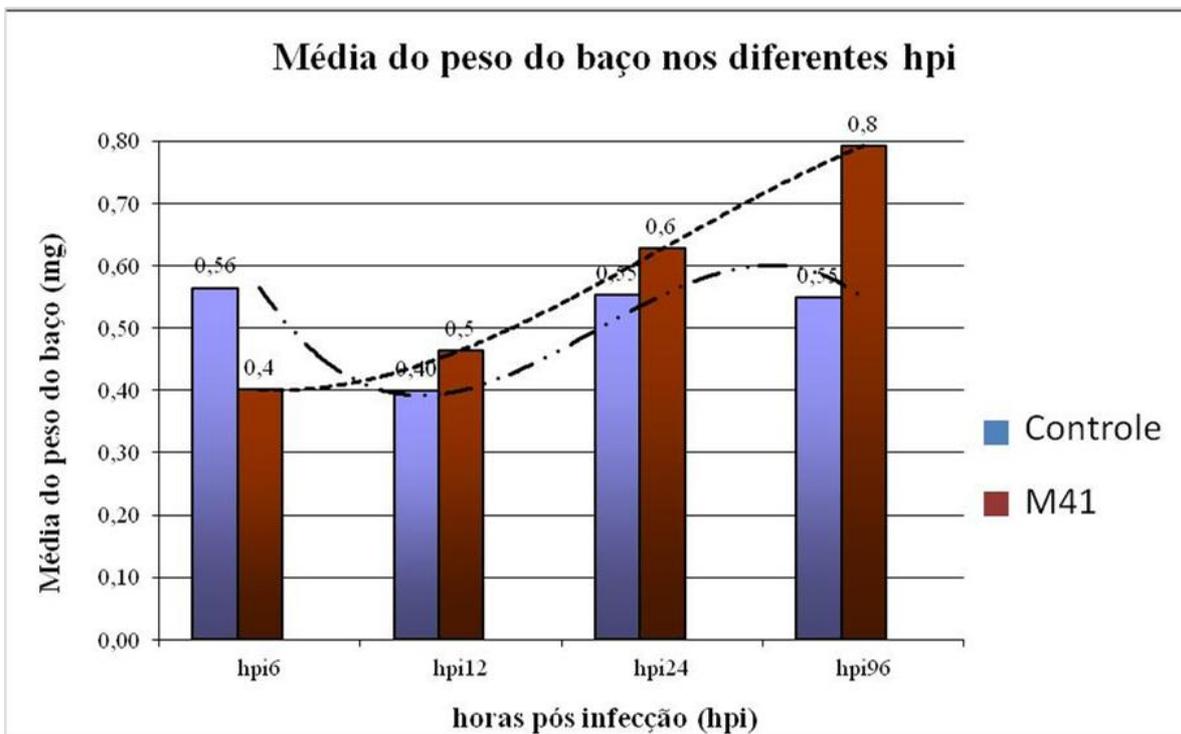


Figura 8. Relação do peso do baço das aves controles e infectadas em diferentes horas pós infecção.

Gene	Primer	Sequence (5'-3')	pb	Acession no.
<b>TLR3</b>	F	GCAACACTTCATTGAATAGCCTTGAT	92	EF137861
	R	GCCAAACAGATTTCCAATTGCATGT		
<b>INF<math>\alpha</math></b>	F	GGACATGGCTCCCACACTAC	74	X92477
	R	TCCAGGATGGTGTCTGTTGAAG		
<b>INF<math>\beta</math></b>	F	ACAACCTCCTACAGCACAACAATA	82	NM_001024836.1
	R	ACGTGTCGGAAGCAGTCAC		
<b>GAPDH</b>	F	TGCCATCACAGCCACACAGAAG	123	AF047874.1
	R	ACTTTCCCCACAGCCTTAGCAG		
<b><math>\beta</math> – actina</b>	F	ATGAAGCCCAGAGCAAAAGA	134	L08165.1
	R	CTCCTCAGGGGCTACTCTCA		
<b>MRPS27</b>	F	GCTTGTTCTTGCTCCCCTC	104	427216
	R	TAACCCTGACCACCCAATC		

Tabela 7. Sequências dos primers utilizados na PCR em tempo Real