



BRUNO ANTUNES SOARES

**SELEÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E CLONAGEM
DOS GENES fljB E groEL AGONISTAS DOS
RECEPTORES DE RECONHECIMENTO DE
PADRÃO DO SISTEMA IMUNE DAS AVES**

LAVRAS – MG

2013

BRUNO ANTUNES SOARES

**SELEÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E CLONAGEM DOS GENES *fljB* E
groEL AGONISTAS DOS RECEPTORES DE RECONHECIMENTO DE
PADRÃO DO SISTEMA IMUNE DAS AVES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dra. Ana Paula Peconick

Coorientador

Dra. Priscilla Rochele Barrios

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Soares, Bruno Antunes.

Seleção, caracterização e clonagem dos genes fljB e groEL
agonistas dos receptores de reconhecimento de padrão do sistema
imune das aves / Bruno Antunes Soares. – Lavras : UFLA, 2013.

71 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Ana Paula Peconick.

Bibliografia.

1. Imunologia. 2. Proteína recombinante. 3. PAMP. 4. Flagelina.
5. DAMP. 6. HSP60. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.20896079

BRUNO ANTUNES SOARES

**SELEÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E CLONAGEM DOS GENES *fljB* E
groEL AGONISTAS DOS RECEPTORES DE RECONHECIMENTO DE
PADRÃO DO SISTEMA IMUNE DAS AVES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2013.

Dra. Priscilla Rochele Barrios	UFLA
Dr. Geraldo Márcio da Costa	UFLA
Dr. Nelson Rodrigo da Silva Martins	UFMG

Dra. Ana Paula Peconick
Orientador

LAVRAS – MG

2013

Aos meus pais Abílio e Elzita,
com todo o carinho e amor.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais, pelo amor, incentivo, força e compreensão durante todo esse período;

Em segundo, a minha orientadora Ana Paula Peconick, pela amizade, ensinamentos em Imunologia e Biotecnologia, incentivo, paciência e preocupação constante, muito obrigado!

À Dra. Priscilla Rochele Barrios, pela amizade, carinho, palavras de incentivo e acompanhamento constante;

À Dra. Solange Aparecida Ságio, pelos ensinamentos em Biotecnologia, e pelo acompanhamento integral nas atividades. Muito obrigado!

Ao professor Antônio Chalfun Júnior, por toda a estrutura disponibilizada para as atividades e por todos os ensinamentos de Biologia Molecular;

Aos professores; Roberta Hilsdorf Piccoli e Nelson Rodrigo Martins da Silva, pela disponibilidade em contribuir com as cepas bacterianas;

Aos professores; Suely de Fátima Costa, Joziana Muniz Barçante e Geraldo Márcio da Costa, pela credibilidade, incentivo e participação em diversos momentos;

As minhas irmãs; Raphaella e Gabriela, por compreenderem a distância nesses momentos;

As minhas tias; Nininha, Sandra e Inês, pelos ensinamentos constantes;

A família Perini, pela amizade, carinho, preocupação e pelos momentos inesquecíveis. Muito obrigado!

As minhas irmãs de consideração, Silvia e Renata pela amizade, pelo amor e por estarem sempre por perto com palavras de carinho;

Aos meus amigos; Natália, Levy, Dinha, Tássia, Paulo, Livia, Carol, Carla, Régis, Daniela, Tiago, Lili, Raquel, Marcela, Gilberto e Rodrigo, pela amizade e força nesse caminho;

À FAPEMIG, pelo financiamento do projeto, a CAPES, pela concessão de bolsa de estudos e ao programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

“Quando você quer alguma coisa, todo o universo conspira para que você realize o seu desejo.”

Paulo Coelho

RESUMO GERAL

A produção recombinante de agonistas dos receptores do reconhecimento de padrão do sistema imune inato tem fornecido uma nova ferramenta para a produção de imunostimulantes para mamíferos. O padrão molecular associado ao patógeno (PAMP), flagelina, codificado pelo gene *fljB* da *S. Typhimurium* e o padrão molecular associado ao dano (DAMP) HSP60, codificado pelo gene *groEL* da *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (RRPs) do sistema imune inato das aves. No presente estudo, foi feita a clonagem de fragmentos genéticos dos genes *fljB* da *S. Typhimurium* e *groEL* da *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* inseridos no vetor de expressão pET100/D-TOPO e transformados em células de *E. coli* TOP10. Os clones foram avaliados pela PCR de colônia, PCR de DNA plasmidial e sequenciamento genômico para a confirmação da presença desses genes. Na PCR de colônia, foram identificadas em 80%, 60% e 80% das colônias transformadas, a presença dos genes *groEL* (*S. Enteritidis*), *groEL* (*S. Typhimurium*) e *fljB* (*S. Typhimurium*) respectivamente. O sistema de clonagem adotado possibilitou a produção de clones idênticos dos fragmentos genéticos da HSP60 e flagelina das cepas de *Salmonella*, permitindo a utilização posterior desses clones em ensaios de expressão gênica, com potencial futuro de serem utilizados como imunostimulante inespecífico das aves.

Palavras-chave: Imunologia. Proteína recombinante. PAMP. Flagelina. DAMP. HSP60.

GENERAL ABSTRACT

The recombinant production of innate immune system pattern recognition receptor agonists has provided a new tool for the production of immunostimulants for mammals. The molecular pattern associated to the pathogen (PAMP), flageline, coded by the fljB gene of the *S. typhimurium* and the molecular pattern associated to the damage (DAMP), HSP60, coded by the groEL gene of the *S. typhimurium* and *S. enteritidis*, are recognized by pattern recognition receptors (PRRs) of bird innate immune system. In the present study, we performed the cloning of genetic fragments of genes fljB from the *S. typhimurium* and groEL from the *S. typhimurium* and *S. enteritidis* inserted in expression vector pET100/D-TOPO and transformed in *E. coli* TOP10 cells. The clones were evaluated by colony PCR, plasmidial DNA PCR and genome sequencing in order to confirm the presence of these genes. In the colony PCR, we identified the presence of the genes groEL (*S. enteritidis*), groEL (*S. enteritidis*) and fljB (*S. typhimurium*) in 80%, 60% and 80% of the transformed colonies, respectively. The cloning system adopted allowed the production of clones identical to the HSP60 genetic fragments and flaneline of the *Salmonella* strains, allowing the posterior use of these clones in gene expression trials, with the future potential of being used as non-specific immunostimulant for birds.

Key words: Immunology. Recombinant protein. PAMP. Flageline. DAMP. HSP60.

LISTA DE FIGURAS

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

Figura 1	Eletroforese em gel de agarose com os produtos de PCR dos genes agonistas	57
Figura 2	Eletroforese em gel de agarose com os produtos de PCR com extremidades coesivas para inserção no vetor de clonagem.....	59
Figura 3	Eletroforese em gel de agarose com os produtos de PCR das colônias que receberam o vetor de clonagem com o inserto dos fragmentos dos genes.....	60
Figura 4	Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com o DNA plasmidial proveniente do cultivo de colônias positivas na PCR de colônia	61

LISTA DE QUADROS

PRIMEIRA PARTE

Quadro 1	Receptores de reconhecimento de padrão presentes nas aves com seus respectivos agonistas PAMPs e DAMPs.....	26
----------	---	----

ARTIGO 1

Quadro 1	Iniciadores para o gene <i>fljB</i> da <i>Salmonella</i> Typhimurium e gene <i>groEL</i> da <i>S. Typhimurium</i> e <i>S. Enteritidis</i>	50
Quadro 2	Iniciadores <i>forward</i> de PCR com extremidades coesivas para inserção dos fragmentos genéticos no vetor de clonagem.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs	Células apresentadoras de antígenos
BCRs	Receptores de células B
CpG	Sequência não metilada de citosina e guanina do DNA
DAMPs	Padrões moleculares associado ao dano
dsRNA	RNA de fita dupla
gp96	Proteína de choque térmico produzido em tumores específicos
HSP	Proteínas de choque térmico
INF	Interferons
IL	Interleucinas, seguidas
LPS	Lipopolissacarídeos
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
mRNA	RNA mensageiro
NF- κ B	Fator nuclear κ B
NLRs	Receptores semelhante à NOD
PAMPs	Padrões moleculares associado ao patógeno
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
RLRs	Receptores semelhantes à RIG
ssRNA+	RNA de fita simples no sentido sense
TNF	Fator de necrose tumoral
TLRs	Receptores da família “Toll- like”

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO 14
2	REFERENCIAL TEÓRICO 17
2.1	Sistema Imune Inato das Aves..... 17
2.1.1	Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRPs)..... 19
2.1.1.1	Receptores “Toll-like” 20
2.1.2	Agonistas dos receptores de reconhecimento de padrões 24
2.1.2.1	Flagelina Bacteriana..... 26
2.1.2.2	Proteínas de Choque Térmico (HSP)..... 29
2.2	Interação dos Sistemas Inato e Adaptativo 32
	REFERÊNCIAS..... 33
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO..... 42
	ARTIGO 1 Seleção, caracterização e clonagem dos genes fljB e groEL agonistas dos receptores de reconhecimento de padrão do sistema imune inato das aves..... 42

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira em 2011 produziu 13,05 milhões de toneladas de carne de frango, e mesmo sofrendo desafios como a instabilidade cambial e aumentos nos custos de insumos, o setor permaneceu como principal exportador mundial deste produto. Além da carne são exportados matrizes e material genético, como pintinhos e ovos embrionados (UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA - UBA, 2012).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento consolidaram e estruturaram o Programa de Sanidade Avícola em 1994, devido à importância do setor no contexto nacional e internacional. O programa visa, dentre outros objetivos, a profilaxia de diversas enfermidades, tais como a doença de Marek, Newcastle, salmoneloses, micoplasmoses e outras. Essas preocupações com a sanidade dos plantéis avícolas e também o bem-estar das aves são pontos cruciais para a produção de alimentos com segurança alimentar e têm poder decisivo nas direções econômicas e sociais da avicultura (KAISER, 2010).

A resposta aos patógenos invasores, por meio da inflamação e ativação do sistema imune adaptativo são iniciadas e coordenadas pela resposta imune inata. O reconhecimento de microorganismos patogênicos pelo sistema de defesa inato é função de uma classe de receptores celulares conhecido como receptores do reconhecimento de padrões (PRRs), que incluem dentre outros os receptores “Toll-like” (TLRs). O sistema imune inato usa esses receptores para reconhecer motivos moleculares conservados evolutivamente denominados padrões moleculares associado ao patógeno (PAMPs) de microorganismos infecciosos e moléculas endógenas liberadas em situações de lesão celular denominadas padrões moleculares associado ao dano (DAMP). A ativação por PAMPs e

DAMPs leva a ativação de vias de sinalização intracelular que iniciam mecanismos microbicidas das células do sistema imune natural, a produção de citocinas inflamatórias e de moléculas coestimulatórias (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002).

Um grande potencial de aplicação do estudo dos TLR e dos agonistas que induzem a expressão desses está centrado na utilização de imunomoduladores inespecíficos. Já foram publicados trabalhos avaliando a possibilidade de alguns agonistas funcionarem, inclusive, como adjuvantes (METCALFE et al., 2010; SKOUNTZOU et al., 2010).

Desafios vivenciados na produção de aves como mudanças ambientais na produção, diversidade biológica e o desenvolvimento de mecanismos de escape do sistema imune aviário por diversos microorganismos, corroboram com a necessidade de novas formas de promover maior proteção do hospedeiro contra a infecção de patógenos (KAISER, 2010).

A vacinação é um dos métodos com melhor custo-benefício avaliado para prevenir perdas econômicas e aumentar a qualidade de vida dos animais domésticos (AUCOUTURIER; DUPUIS; GANNE, 2001). Muitos imunógenos, na área de medicina veterinária, ainda são produzidos utilizando-se uma tecnologia convencional, tais como vacinas atenuadas. Porém, em adição a esses, pesquisas de ponta que utilizam ferramentas de biotecnologia, são usadas em alguns ou em todos os estágios no desenvolvimento de vacinas e imunomoduladores (BABIUK, 2002).

A produção de proteínas heterólogas é uma alternativa promissora para a produção de imunobiológicos, como vacinas, adjuvantes e imunoestimulantes inespecíficos, inclusive com custos de produção mais acessíveis. A engenharia genética é uma ferramenta de relevância para aumentar a vantagem comparativa dos países em desenvolvimento. O desenvolvimento de novos e melhores produtos imunoestimulantes, não possui apenas conotações de natureza

científica e tecnológica, mas um aumento de poder político, econômico e social (FRANCIS, 2001).

Assim, objetivou-se, com este trabalho selecionar, caracterizar e clonar transgenes agonistas dos receptores de reconhecimento de padrões presentes nas células do sistema imune inato, com potencial futuro de serem expressos de forma recombinante e utilizados como imunoestimulante inespecífico das aves.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Sistema Imune Inato das Aves

O sistema imune dos vertebrados pode ser dividido em sistema inato e adaptativo. O sistema imune inato é filogeneticamente mais antigo e é considerado a primeira linha de defesa, dado a capacidade de induzir uma resposta rápida e inespecífica quando em contato com agentes invasores. Nesse sistema, componentes celulares podem responder a estruturas comuns compartilhadas entre diferentes agentes infecciosos (MIYAJI et al., 2011). Em contrapartida, a imunidade adaptativa proporciona respostas mais específicas, sendo considerada a segunda linha de defesa a infecção, caracterizada por um grande conjunto de moléculas efetoras capazes de reconhecer e eliminar patógenos conhecidos e estabelecerem um estado de memória para infecções subsequentes (MOSER; LEO, 2010).

Novos estudos nos mecanismos imunológicos têm elucidado atividades mais complexas do sistema imune inato, destacando papéis que não eram conhecidos (BEUTLER, 2004; JUUL-MADSEN et al., 2008; MOSER; LEO, 2010). A imunidade inata é a principal resposta contribuinte para a inflamação aguda, induzida pela infecção microbiana, ou por danos teciduais (AKIRA et al., 2006; BEUTLER et al., 2006). A resposta imune inata atua no reconhecimento de estruturas que são compartilhadas por diferentes microorganismos, na ativação dos mecanismos efetores que destroem grande parte dos microorganismos encontrados, e na ativação e modulação de uma resposta imune adaptativa (VASSELON; DETMERS, 2002).

De forma geral, a imunidade inata é representada de diversas formas, sendo estruturada por barreiras constitutivas (tecidos epiteliais e moléculas que

revestem a mucosa), componentes químicos antimicrobianos (lisozima), sistema complemento e células especializadas (JUUL-MADSEN et al., 2008).

Aves e mamíferos apresentam algumas semelhanças no sistema imune, entretanto diferenças tanto em termos de genes, moléculas, células e órgãos foram descritas (KAISER, 2010). Receptores do sistema imune inato, como os receptores “Toll-like” apresentam diferentes repertórios em aves (Quadro1) (TEMPERLEY et al., 2008), assim como citocinas e quimiocinas (KAISER et al., 2005), anticorpos e outras moléculas imunitárias (KAISER, 2007). Em relação às células, as aves possuem pequenas quantidades de eosinófilos, e apresentam os heterófilos que correspondem ao neutrófilo funcional dos mamíferos. Anatomicamente, não possuem nódulos linfoides, mas têm um órgão linfóide considerado central que é a bursa de Fabricius, responsável pelo desenvolvimento de células B, ausente em outras espécies. Embora alguns componentes sejam diferentes entre espécies, a base da resposta imune inata na condução da resposta imune adaptativa para eliminar a infecção inicial e promover memória imunológica permanece constante para aves e mamíferos (KAISER, 2010).

Os heterófilos são considerados as principais células efetoras da resposta imune inata, sendo o primeiro tipo celular a responder a infecção. Esses componentes atuam como fagócitos debrando agentes patogênicos pela liberação de substâncias tóxicas como metabólitos do oxigênio reativos, enzimas líticas, peptídeos antimicrobianos e apresentam um grande potencial em responder a invasão de microorganismos em um curto intervalo de tempo (30 minutos) após a infecção. Suas atividades fagocíticas são consideradas mais eficientes comparadas com as exercidas pelos macrófagos (FARNELL et al., 2003; JUUL-MADSEN et al., 2008; KOGUT et al., 1995).

As células dendríticas, capturam e processam os antígenos, e são consideradas células apresentadoras de antígenos (APCs) profissionais devido a

capacidade de ativar células do sistema imune adaptativo, como as células T “naïve”, e por expressar altos níveis do complexo de histocompatibilidade principal MHC e moléculas coestimulatórias na sua superfície (WU; KAISER, 2011). Em mamíferos, as células dendríticas se encontram em tecidos periféricos no estado imaturo, entretanto quando capturam e processam antígenos, migram para nódulos linfóides onde atuam como APCs (MOSER; LEO, 2010). Nas espécies aviárias, a ausência de nódulos linfóides linfóides deixa mal compreendido os eventos de apresentação de antígenos por esse tipo celular (KAISER, 2010).

2.1.1 Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRPs)

O reconhecimento dos patógenos na imunidade inata são mediados por elementos codificados na linha germinal denominados Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRPs) (JUUL-MADSEN et al., 2008). O sistema inato usa os RRP's para reconhecer padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) de microorganismos infecciosos e padrões moleculares associados aos danos (DAMPs) que são ligantes endógenos, muitas vezes referidos como “sinais de perigo” liberados durante o dano tecidual ocorrido em sítios infecciosos e de necrose celular (DREXLER; FOXWELL, 2010; MOSER; LEO, 2010; TAKEUCHI; AKIRA, 2010; TAPING, 2009).

A ativação dos RRP's leva a ativação de vias de sinalização intracelular que culminam na translocação nuclear de um conjunto de fatores de transcrição, incluindo o NF- κ B, AP-1, IRFs e C/EBP β . Esses fatores resultam em mecanismos microbicidas, produção de substâncias pro e anti-inflamatórias, e sobre a regulação de moléculas coestimulatórias realizam o recrutamento de células imunes inatas, e a apresentação de antígenos para o sistema imune (ADEREM; ULEVITCH, 2000; DALPKE; HEEG, 2002; JANEWAY;

MEDZHITOV, 2002; KAWAI; AKIRA, 2011; KOGUT et al., 2005; KOGUT; HE; GENOVESE, 2012; O'NEILL, 2002).

Na imunidade adaptativa, linfócitos B e T realizam o reconhecimento por meio de receptores celulares que sofrem rearranjo genético e consequentemente apresentam maior diversidade de especificidades (JUUL-MADSEN et al., 2008; MOSER; LEO, 2010). As diferenças genéticas desses receptores demonstram que o desafio primário do sistema imune inato é a discriminação de um grande número de microorganismos com o uso de um número limitado desses receptores (ADEREM; ULEVITCH, 2000).

Atualmente, diferentes classes de famílias de RRP's foram identificadas. Dentre essas famílias incluem proteínas transmembranares representados pelos receptores do tipo "Toll-like" (TLRs), receptores similares à lectina de tipo C, receptores *scavenger*, e proteínas citoplasmáticas que compreende os receptores semelhantes a RIG (RLRs), receptores semelhante a NOD (NLRs). Estes RRP's são expressos em macrófagos, APCs e células imunitárias não profissionais (células epiteliais, células endoteliais e fibroblastos) (KAISER, 2010).

2.1.1.1 Receptores "Toll-like"

Os receptores "Toll-like" (TLR) foram identificados pela primeira vez em 1985 como componente no desenvolvimento embrionário da *Drosophila* (ARBOUR et al., 2000), determinando a polaridade dorso-ventral na embriogênese dessas moscas (SUZUKI et al., 2002). Posteriormente, a função dos TLR foi associada à resposta imune contra fungos (ARBOUR et al., 2000; SUZUKI et al., 2002), bactérias (ANDERSON, 2000), e também na resistência a doenças (MUZIO; MANTOVANI, 2000).

Segundo Bauer et al. (2001), estes receptores exercem a função de discriminar os diferentes patógenos, tanto em vertebrados como em

invertebrados, e estão envolvidos em um sistema de sinalização que é conservado em mamíferos, aves, insetos e plantas (MEANS; GOLENBOCK; FENTON, 2000).

A função primária de todos os RRs é promover a identificação e proteção imediata contra patógenos invasores. Os resultados da indução dos TLRs são: produção de peptídeos antimicrobianos, citocinas tais como interleucina (IL-1 e IL-6), fator de necrose tumoral (TNF), quimiocinas que coletivamente induzem a resposta inflamatória aguda contra patógenos e Interferons do tipo I (INF-1) que favorece a transcrição de muitas proteínas antivirais (PASARE; MEDZHITOV, 2004).

A expressão na superfície celular de TLR corresponde a milhares de moléculas por célula nos monócitos e centenas ou menos nas células dendríticas. Contudo, a expressão de TLR pode ser observada em outras células como: célula vascular endotelial, adipócitos, miócitos cardíacos e células epiteliais intestinais (AKIRA; TAKEDA; KAISHO, 2001).

Os linfócitos B, além de expressarem clones de receptores somaticamente rearranjados, os receptores de células B (BCRs), também expressam a maioria dos TLRs conhecidos. Desta forma, essas células são capazes de responder aos ligantes dos TLRs que podem induzir a proliferação de linfócitos B, a expressão de moléculas coestimulatórias e até genes necessários para diferenciação em células secretoras de anticorpos, os plasmócitos (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002).

A ligação do TLR ao seu respectivo ligante leva a sinalização intracelular que depende de alguns componentes moleculares. Um total de cinco proteínas adaptadoras estão presentes no citoplasma das células para carregar o sinal enviado pelos TLRs. Essas moléculas adaptadoras são conhecidas como: MyD88, MAL (ou Tirap), TRIF (ou Ticam-1), MyD88-4 (algumas vezes chamadas de TRIP ou TRAM) e My D88-5. Estas estão relacionadas com a

ativação de outras moléculas, em uma cascata de eventos de ativação, que leva a transcrição nuclear de mediadores químicos. A maioria dos TLR possuem a via de sinalização dependente da MyD88, sendo que alguns são independente desta via (BEUTLER, 2004).

O perfil diferencial da expressão de genes dos TLRs foi observado em infecções experimentais nas aves. A ampla expressão dos diferentes TLRs nas células imunes inatas reflete os processos de como esses hospedeiros combatem infecções bacterianas, virais, fúngicas e parasitárias (KOGUT et al., 2005).

Estudos vêm demonstrando que a conservação entre diferentes espécies de regiões homólogas desses receptores, pode ser alvo de pesquisas de seleção genética para espécies com menor susceptibilidade à enfermidades (KEESTRA et al., 2008; KOGUT et al., 2005). Um dos animais domésticos que tem recebido maior atenção são as aves (*Gallus gallus domesticus*) devido ao potencial desses animais atuarem como reservatórios para patógenos bacterianos e virais que acometem os humanos (KEESTRA et al., 2008).

Nas aves foram mapeados no cromossomo 4 de frangos, os TLR2 (ChTLR2) tipo 1 e tipo 2, e foi observado que esses receptores respondiam a lipoproteínas bacterianas e ao LPS, o que sugeriu a homologia aos TLR2 e TLR4 dos mamíferos (BOYD et al., 2001; FUKU et al., 2001). O TLR4, quando expresso em macrófagos de aves leva a expressão da enzima responsável pela síntese do óxido nítrico (DIL; QURESHI, 2002). O DNA CpG também induz a produção de óxido nítrico nos macrófagos dessas espécies (HE et al., 2003).

O TLR3 em aves, que reconhece poli I:C, estimula a produção de INF- β , e a presença desse interferon também favorece a expressão do TLR3, representando uma via de mão dupla na ativação da resposta inata (KARPALA; LOWENTHAL; BEAN, 2008).

O TLR5 nas aves está localizado no cromossoma 3 e são expressos em quase todos os tecidos e células (RUAN; WU; ZHENG, 2011). Nas espécies

aviárias, alguns estudos demonstram que células expressando o TLR5 se ligam a flagelina bacteriana (KEESTRA et al., 2008), o que remete em uma resposta imune inata a diversos patógenos bacterianos de importância avícola que possuem a subunidade flagelina, como *E. coli* patogênica aviária, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium e *Campylobacter jejuni*. Entretanto, foi comprovado que algumas células das aves podem ter ausência de TLR5, como os monócitos. He et al. (2003) analisaram o perfil de expressão de TLR nos monócitos de frango e detectaram a expressão de TLR2, 3, 4, 6 e 7, sendo ausente a expressão de TLR5.

Aspectos genômicos dos TLR's abordados por Putten, Bouwman e De Zoete (2010) demonstram que a existência de genes polimórficos resulta em respostas imunes inatas diferentes entre hospedeiros. Alcaide e Edwards (2011), com base nas análises de sequenciamento genético das diversas espécies de aves, observaram que o TLR5 e TLR15 apresentam o maior grau de polimorfismo genético e possuem maior ocorrência de substituições de aminoácidos não conservados. A variabilidade genética desses receptores entre espécies de aves pode explicar as diferentes respostas imunes aos patógenos.

2.1.2 Agonistas dos receptores de reconhecimento de padrões

As substâncias agonistas dos RRs são denominadas de Padrões Moleculares Associados ao Patógeno, os PAMPs. Estes representam diversas moléculas dos patógenos microbianos, tais como ácidos nucléicos, proteínas, lipoproteínas, carboidratos que são compartilhadas por classes de microorganismos e que são responsáveis no reconhecimento desses agentes pelo sistema imune inato, principalmente por via dos TLRs. A ligação dos PAMPs aos seus receptores específicos resulta na ativação de algumas células imunes inatas para a destruição do patógeno e pode modular a ativação das respostas imunes adaptativas quando necessárias (BIANCHI, 2007).

Estudos demonstraram que os heterófilos expressam constitutivamente TLR1, TLR6, TLR10, TLR2 tipo 1 e tipo 2, TLR3, TLR4, TLR5 e RNAm do TLR7 (JUUL-MADSEN et al., 2008; KAISER, 2010). Dentre os PAMPs para esses receptores estão a flagelina (de *Salmonella* Typhimurium), peptídeoglicano (de *Staphylococcus aureus*), lipopolissacarídeos ultra puros (da *Salmonella* Minnesota), dupla fita de RNA sintético análogo (poli I:C), análogo de guanosina e outros (Quadro 1) (IWASAKI; MEDHITOV, 2004; PUTTEN; BOUWMAN; DE ZOETE, 2010; WERLING; JUNGI, 2003).

Os diversos agonistas existentes levam a expressão aumentada do RNAm de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e IL-8), e o aumento da fosforilação de outras proteínas envolvidas com o controle antimicrobiano nos heterófilos (FARNELL et al., 2003; KOGUT et al., 2005).

Ligantes de TLRs têm sido empregados em vista de promover ação imunoproliferativa em aves conferindo aumento da imunidade desses animais a microorganismos patogênicos, incluindo *S. Enteritidis* (GENOVESE et al., 2007; HE et al., 2003), *E. coli* (GOMIS et al., 2004; PAUL et al., 2012), vírus da

doença de Marek, vírus da bronquite infecciosa e o vírus da influenza aviária (CHAUNG et al., 2012).

Os danos teciduais e celulares gerados no hospedeiro em situações assépticas, como queimaduras, insultos químicos, radiação, ausência de nutrientes essenciais, levam o organismo a liberar moléculas endógenas que são classificadas como padrões moleculares associados ao dano, DAMPs (BIANCHI, 2007). Estas substâncias, como ATP, proteínas de choque térmico (HSPs), ácido úrico, proteína nuclear HMGB1 representam outra classe de agonistas de RRs (NEWTON; DIXT, 2012).

Os DAMPs são detectados por diversos RRs que ainda não são bem especificados (POCKLEY, 2001). Entretanto, recentes pesquisas vêm demonstrando que essas moléculas endógenas possuem a capacidade de ativar alguns TLRs (Quadro 1). Os TLRs mais referidos como ativados por DAMPs são os TLR2 (ASEA et al., 2002; BASU et al., 2001; ERRIDGE, 2010; LI; MENORET; SRIVASTAVA, 2002; VABULAS et al., 2002). Algumas proteínas de choque térmico (HSP) têm sido caracterizadas como potentes ativadoras de TLRs (ASEA et al., 2002; VABULAS et al., 2002). Dentre essas, a HSP60 foi relatada como responsável por induzir a produção de citocinas pelo TLR4 (OHASHI et al., 2000).

Receptor de reconhecimento de padrão	PAMP	DAMP
TLR1LA e TLR1LB	Lipopeptídeos triacil e diácil	α -defensinas
TLR2A e TLR2B	Peptideoglicano, lipoproteínas, arabinoman, zimosan de fungos	Proteína surfactante A, proteínas de choque térmico (HSP60)
TLR3	dsRNA	mRNA
TLR4	Lipopolissacarídeos, envelopes de glicoproteínas, glicoinositolfosfolipídios	Domínio extra de fibronectina, fragmentos de sulfato de heparina, proteínas de choque térmico (HSP60, HSP70 e gp96)
TLR5	Flagelina bacteriana	-
TLR7/ TLR8	ssRNA de vírus, nucleotídeos sintéticos modificados	ssRNA
TL15	-	-
TLR21	Motivos CpG	-

Quadro 1 Receptores de reconhecimento de padrão presentes nas aves com seus respectivos agonistas PAMPs e DAMPs

Fonte: Adaptado de Juul-Madsen et al. (2008), Kaiser (2010), Kono e Rock (2008) e Myiaji et al. (2011).

2.1.2.1 Flagelina Bacteriana

Bactérias móveis exibem em suas superfícies estruturas denominadas flagelos que são essenciais na patogenicidade desses microorganismos por permitir motilidade e adesão. A atividade flagelar é interligada à maquinaria

quimiotática que é sensível a informações físicas e químicas do ambiente e orquestra a migração bacteriana para o crescimento e a sobrevivência (MACNAB, 2003).

O filamento flagelar é composto por milhares de subunidades de uma única proteína, denominada flagelina. As massas moleculares dessas subunidades variam entre as espécies bacterianas, compreendendo um peso de 28 a 80 kDa. O alinhamento da sequência das flagelinas mostra regiões conservadas (aproximadamente 170 N- e 100 resíduos C-terminal) flanqueando uma região central que é hipervariável tanto na composição quanto no tamanho dos resíduos (RAMOS; RUMBO; SIRARD, 2004). As cadeias N- e C-terminal da flagelina formam estruturas alfa-hélice empacotadas que constituem de domínios D0 e D1 da região conservada. A região variável da flagelina é exposta como uma estrutura semelhante a uma estrutura β -pregueada, correspondendo aos domínios D2 e D3 com o filamento externo (YONEKURA; MAKI-YONEKURA; NAMBA, 2003).

Bactérias patogênicas, especificamente portadoras de genes codificadores de estruturas flagelares, expressam a flagelina para promover motilidade, colonização e invasão da mucosa. O gênero *Salmonella* apresenta um mecanismo de alternância da fase flagelar em que ocorre a expressão de um dos dois genes responsáveis por codificar a flagelina, o *fliC* ou *fljB* (BONIFIELD; HUGHES, 2003).

Outras funções foram referidas a flagelina, como a indução da resposta imune inata (RAMOS; RUMBO; SIRARD, 2004). Essa proteína exibe algumas características de PAMPs, incluindo sequência conservada, componente vital para o organismo e larga distribuição entre bactérias, sendo capazes de induzir o TLR5 (BERIN et al., 2002; HAYASHI et al., 2001; RAMOS; RUMBO; SIRARD, 2004; ZENG et al., 2003).

A indução do TLR5 ocorre com a ligação de monômeros de flagelina. O domínio hipervariável da flagelina não é necessário para a sinalização de TLR5 (EAVES-PYLES et al., 2001; SMITH et al., 2004; YONEKURA; MAKI-YONEKURA; NAMBA, 2003). Este por sua vez, detecta uma conformação específica do domínio D1 da flagelina que é necessário para a formação e função do flagelo, e é exposto apenas na forma monomérica (RAMOS; RUMBO; SIRARD, 2004). Mutações no domínio conservado D1 têm efeito no reconhecimento da flagelina pelo TLR5 assim como na atividade da motilidade do flagelo (EAVES-PYLES et al., 2001; SMITH et al., 2004).

Flagelinas provenientes de *S. Typhimurium*, *S. Dublin* e *S. Enteritidis*, *E. coli* enteropatogênica e *P. aeruginosa* estimulam nas células epiteliais a secreção polarizada de IL-8, quimiocina essencial para o recrutamento de neutrófilos e macrófagos em locais de infecção, IL-2, síntese de intermediários reativos de oxigênio (iNOS) e óxido nítrico (BERIN et al., 2002; EAVES-PYLES et al., 2001; GEWIRTZ et al., 2001; HYBISKE et al., 2004; ZENG et al., 2003). Esses fatores exercem importantes mecanismos na imunidade inata do hospedeiro, como recrutamento de células “Natural Killer” (NK), ativação da fagocitose e apresentação de antígenos.

Estudo conduzido por Kogut, He e Genovese (2012) demonstraram que a flagelina foi um potente indutor para a produção de mediadores inflamatórios em heterófilos de frangos. Os mediadores analisados, como leucotrieno-B4 e prostaglandina tiveram um aumento de 3 a 5 vezes comparado com o grupo controle ausente de estimulação, desta forma esse trabalho realça o papel da flagelina como PAMPs nas respostas inflamatórias aviárias.

Iqbal et al. (2005) demonstraram que a perda de flagelina da *S. Typhimurium* conferiu a esse microrganismo uma maior capacidade de estabelecer infecção sistêmica em aves. De acordo com Ruan, Wu e Zheng (2011), sorovares de *Salmonella Enteritidis* não flagelares causam infecções

sistêmicas mais agudas que os sorovares flagelares. Essas atividades podem ser explicadas pela ausência da flagelina para ativar o TLR5, que induz respostas para o controle de patógenos microbianos. Desta forma, a funcionalidade integral do TLR5 tem relevância no controle e na susceptibilidade de doenças nas aves.

Estudos recentes têm investigado a habilidade da flagelina de induzir respostas a células T antígeno-específicas quando administrada em vacinas vivas ou atenuadas (HULEATT et al., 2007). A utilização da flagelina recombinante associada a antígenos específicos tem aumentado a imunogenicidade, com aumento de respostas humorais e celulares (HULEATT et al., 2007; SKOUNTZOU et al., 2010).

Chung et al. (2012) avaliaram o efeito imunoestimulante de duas formas da flagelina da *Salmonella* (recombinante e purificada) inoculadas em aves imunizadas com vacinas para o vírus da influenza aviária (H5N2). Foram obtidos tanto nos ensaios *in vitro* como *in vivo* a expressão do TLR5, sugerindo a possibilidade desse agonista como adjuvante para vacinas para o H5N2. Outros papéis que são atribuídos a ativação do TLR5 pela flagelina é a indução da imunidade adaptativa do tipo Th2 (CUNNINGHAM et al., 2004; DIDIERLAURENT et al., 2004) e o aumento de níveis de IgA (LEE et al., 2006).

2.1.2.2 Proteínas de Choque Térmico (HSP)

As proteínas de choque térmico (HSPs) são expressas constitutivamente em todas as células de mamíferos, aves, plantas e em microorganismos e são classificadas como chaperoninas moleculares. Essas proteínas são essenciais para vários processos celulares, e têm por função: reconhecer e ligar cadeias polipeptídicas de proteínas nascentes e intermediárias, prevenir a agregação

imprópria, promover o direcionamento adequado do dobramento das proteínas, realizar o transporte de proteínas por membranas, estabilizar fatores de transcrição celular e proteger as proteínas celulares durante a exposição a situações de estresse (WALLIN et al., 2002). Outra função relevante das HSPs é na atuação como DAMPs, quando liberadas pelas células em circunstâncias de estresse (BIANCHI, 2007).

As HSPs microbianas possuem perfil imunoestimulante baseado em três aspectos importantes. Inicialmente, essas proteínas são reconhecidas por receptores endocíticos e são internalizadas nas APCs (BASU et al., 2001), em seguida ocorre o deslocamento de peptídeos oriundos dessa internalização para apresentação por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (TOBIAN et al., 2004; WALLIN et al., 2002). Outro fator apontado por alguns trabalhos é a capacidade de HSPs induzir a maturação fenotípica e funcional das APCs (NOESSNER et al., 2002; SOMERSAN et al., 2001; WALLIAN et al., 2002).

Ensaio experimentais realizados por Stewart et al. (2001) revelaram que a indução da expressão de genes que codificam HSPs microbianas pode proporcionar novas estratégias para aumentar a resposta imune de indivíduos contra microorganismos patogênicos. Nesses estudos foi observado que uma estirpe de *Mycobacterium tuberculosis* ao expressar em grande quantidade suas proteínas de choque térmico apresentou redução da sua sobrevivência no hospedeiro.

O reconhecimento de HSPs microbianas por células imunes inatas já foi constatado por grupos de pesquisa (STEWART; YOUNG, 2004; WALLIN et al., 2002). A adoção de preparações de HSPs (HSP60, HSP70, HSP90 e gp96) de diversas fontes (bactérias e mamíferos) foram relatadas como potentes ativadoras *in vitro* do sistema imune inato, especificamente por estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- γ , IL-1, IL-6 e IL-12,

liberação de quimionas por monócitos, macrófagos e células dendríticas, indução e maturação de células dendríticas, além de estimular a proliferação, migração e atividade citolítica das células NK (TSAN; GAO, 2009).

As HSPs ao interagir com os TLR2 e TLR4 levam a ativação do fator de transcrição NF- κ B no ambiente intracelular, que resulta na expressão dos genes pró-inflamatórios responsáveis por produzir determinadas citocinas, como TNF, IL1 e IL6 (ASEA et al., 2002; VABULAS et al., 2002).

A especificidade do reconhecimento de HSPs por determinados RRs, como os TLRs é ainda discutido. O potencial de indução de TLRs por HSP não próprias do hospedeiro é questionado (TSAN; GAO, 2009). Esses autores acreditam que esses relatos da capacidade de HSPs ativarem esses receptores da família “*Toll-like*” podem ser atribuídas à associação de HSPs recombinantes ou purificadas com resíduos provenientes de patógenos que atuam como PAMPs, como a endotoxina LPS. Esses autores ainda ressaltam que mesmo as HSPs recombinantes terem um alto grau de purificação, essas geralmente são produzidas em *E. coli*, e moléculas remanescentes desses hospedeiros de expressão podem resultar na ativação desses receptores.

Luong et al. (2012) testaram a HSP70 recombinante livres de LPS, e avaliaram a resposta imunológica. Nesse estudo foi observado que a HSP70 recombinante livre de LPS apresentou menor efeito imunoestimulatório comparada com o grupo em que a HSP apresentou resíduo de LPS. Nesse estudo, a expressão do TLR foi discutida não apenas pelo LPS atuar como agonista PAMP desses receptores, mas pelo grau de contaminação ter sido considerado baixo e insuficiente para promover o estímulo do TLR4. Os autores acreditam que o efeito estimulatório da HSP70 no TLR4 requer a associação em parte do LPS. Portanto, fica evidenciado que associações de HSPs com determinados PAMPs nas respostas imunes inatas necessitam de mais estudos para provar os reais efeitos das HSPs na ativação dos TLRs

2.2 Interação dos Sistemas Inato e Adaptativo

A invasão de patógenos no hospedeiro pode ser controlada e resolvida pelo sistema imune inato, entretanto na maioria das situações infecciosas, respostas imunes adaptativas são requeridas para controlar ou debelar o processo infeccioso (IWASAKI; MEDZHITOV, 2004).

A ligação dos TLR das APCs com seus ligantes direciona a regulação positiva do MHC e de moléculas coestimulatórias que são capazes de fornecer os sinais essenciais para a ativação das células T *naïve* (MEDZHITOV, 2001; MIYAJI et al., 2011). Além disso, a modulação do sistema imune adaptativo necessita da apresentação de antígenos por APCs, e das citocinas que são importantes para a expansão clonal de suas células efectoras. Portanto a ligação de PAMPs e DAMPs aos RRP é uma etapa essencial para as respostas imunes adaptativas (WALLIN et al., 2002).

A apresentação de antígenos por APCs as células T, resulta na expansão clonal e ativação dessas células. Existem dois tipos de células T, as células T CD8+ que são células citotóxicas capazes de destruir diretamente células infectadas, e células T CD4 + que são células com distintos fenótipos, com funções celulares (ativação de macrófagos) e humorais (ativação de linfócitos B) (MOSER; LEO, 2010).

REFERÊNCIAS

ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, London, v. 406, n. 6797, p. 782-787, 2000.

AKIRA, S. et al. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, Cambridge, v. 24, p. 783-801, 2006.

AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature Immunology**, New York, v. 2, n. 8, p. 675-680, 2001.

ALCAIDE, M.; EDWARDS, S. V. Molecular evolution of the toll-like receptor multigene family in birds. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 5, p. 1703-1715, 2011.

ANDERSON, K. V. Toll signaling pathways in the innate immune response. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 12, n. 1, p. 13-19, 2000.

ARBOUR, N. C. et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. **Nature Genetics**, New York, v. 25, n. 2, p. 187-190, 2000.

ASEA, A. et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 17, p. 15028-15034, 2002.

AUCOUTURIER, J.; DUPUIS, L.; GANNE, V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. **Vaccine**, Kidlington, v. 19, n. 17/19, p. 2666-2672, 2001.

BABIUK, L. A. Vaccination: a management tool in veterinary medicine. **Veterinary Journal**, London, v. 164, n. 3, p. 188-201, 2002.

BASU, S. et al. DC91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. **Immunity**, Cambridge, v. 14, n. 3, p. 303-113, Mar. 2001.

BAUER, S. et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species: specific CpG motif recognition. **Nature**, London, v. 98, p. 9237-9242, 2001.

BERIN, M. C. et al. Role of EHEC O157: H7 virulence factors in the activation of intestinal epithelial cell NF-kappa B and MAP kinase pathways and the upregulated expression of interleukin 8. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 4, n. 10, p. 635-648, Oct. 2002.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Molecular Immunology**, Elmsford, v. 40, n. 12, p. 845-859, Feb. 2004.

BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 81, n. 1, p. 1-5, Jan. 2007.

BONIFIELD, H. R.; HUGHES, K. T. Flagellar phase variation in *Salmonella enterica* is mediated by a posttranscriptional control mechanism. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, n. 12, p. 3567-3574, 2003.

BOYD, Y. et al. Mapping of chicken and mouse genes for Toll-like receptor 2 (TLR2) to an evolutionarily conserved chromosomal segment. **Immunogenetics**, New York, v. 52, p. 294-298, 2001.

CHAUNG, H. C. et al. *Salmonella* flagellin enhances mucosal immunity of avian influenza vaccine in chickens. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 157, n. 1/2, p. 69-77, 2012.

CUNNINGHAM, A. F. et al. Responses to the soluble flagellar protein FliC are Th2, while those to FliC on *Salmonella* are Th1. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 34, n. 11, p. 2986-2995, Nov. 2004.

DALPKE, A.; HEEG, K. Signal integration following toll-like receptor triggering. **Critical Reviews in Immunology**, Boca Raton, v. 22, n. 3, p. 217-250, 2002.

DIDIERLAURENT, A. et al. Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 172, n. 11, p. 6922-6930, June 2004.

DIL, N.; QURESHI, M. A. Differential expression of inducible nitric oxide synthase is associated with differential Toll-like receptor-4 expression in chicken macrophages from different genetic backgrounds. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 84, n. 3/4, p. 191-207, 2002.

DREXLER, S. K.; FOXWELL, B. M. The role of toll-like receptors in chronic inflammation. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 42, n. 4, p. 506-518, Apr. 2010.

EAVES-PYLES, T. D. et al. Salmonella flagellin-dependent proinflammatory responses are localized to the conserved amino and carboxyl regions of the protein. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 167, n. 12, p. 7009-7016, Dec. 2001.

ERRIDGE, C. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 6, p. 989-999, 2010.

FARNELL, M. B. et al. Oxidative burst mediated by toll like receptors (TLR) and CD14 on avian heterophils stimulated with bacterial toll agonists. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 27, n. 5, p. 423-429, May 2003.

FRANCIS, A. E. The future of vaccines, immunization concepts and practice. **Vaccine**, Kidlington, v. 19, p. 2206-2209, 2001.

FUKU, A. et al. Molecular cloning and functional characterization of chicken toll-like receptors: a single chicken toll covers multiple molecular patterns. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 50, p. 47143-47149, Dec. 2001.

GENOVESE, K. J. et al. Dynamics of the avian inflammatory response to Salmonella following administration of the toll-like receptor 5 agonist flagellin. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 51, n. 1, p. 112-117, Oct. 2007.

GEWIRTZ, A. T. et al. Salmonella typhimurium translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response. **Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v. 107, n. 1, p. 99-109, Jan. 2001.

GOMIS, S. et al. Protection of neonatal chicks against a lethal challenge of *Escherichia coli* using DNA containing cytosine-phosphodiester-guanine motifs. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 48, n. 4, p. 813-822, Dec. 2004.

HAYASHI, F. et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. **Nature**, London, v. 410, n. 6832, p. 1099-1103, Apr. 2001.

HE, H. Q. et al. Identification of CpG oligodeoxynucleotide motifs that stimulate nitric oxide and cytokine production in avian macrophage and peripheral blood mononuclear cells. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 27, n. 6/7, p. 621-627, Jan./July 2003.

HULEATT, J. W. et al. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. **Vaccine**, Kidlington, v. 25, n. 4, p. 763-775, 2007.

HYBISKE, K. et al. Cystic fibrosis airway epithelial cell polarity and bacterial flagellin determine host response to *Pseudomonas aeruginosa*. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 49-63, Jan. 2004.

IQBAL, M. et al. Identification and functional characterization of chicken Toll-like receptor 5 reveals a fundamental role in the biology of infection with *Salmonella enterica* serovar typhimurium. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 4, p. 2344-2350, Apr. 2005.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nature Immunology**, New York, v. 5, n. 10, p. 987-995, Oct. 2004.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 20, p. 197-216, 2002.

JUUL-MADSEN, H. R. et al. Avian innate immune responses. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K. A. (Ed.). **Avian immunology**. London: Academic, 2008. p. 129-158.

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

_____. The avian immune genome a glass half-full or half-empty? **Cytogenetic and Genome Research**, Würzburg, v. 117, n. 1/4, p. 221-230, 2007.

KAISER, P. et al. A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, New Rochelle, v. 8, p. 467-484, 2005.

KARPALA, A. J.; LOWENTHAL, J. W.; BEAN, A. G. Activation of the TLR3 pathway regulates IFN beta production in chickens. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 32, n. 4, p. 435-444, Apr. 2008.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, Cambridge, v. 34, n. 5, p. 637-650, 2011.

KEESTRA, A. M. et al. Functional characterization of chicken TLR5 reveals species-specific recognition of flagellin. **Molecular Immunology**, Elmsford, v. 45, n. 5, p. 1298-1307, Mar. 2008.

KOGUT, M. H. et al. Expression and function of Toll-like receptors in chicken heterophils. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 29, n. 9, p. 791-807, Sept. 2005.

_____. In-vivo activation of heterophil function in chickens following injection with salmonella enteritidis-immune lymphokines. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 57, n. 1, p. 56-62, Jan. 1995.

KOGUT, M. H.; HE, H.; GENOVESE, K. J. Bacterial toll-like receptor agonists induce sequential NF-kappa B-mediated leukotriene B-4 and prostaglandin E-2 production in chicken heterophils. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 145, n. 1/2, p. 159-170, Jan. 2012.

KONO, H.; ROCK, K. L. How dying cells alert the immune system to danger. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 8, n. 4, p. 279-289, 2008.

LEE, S. E. et al. A bacterial flagellin, *Vibrio vulnificus* FlaB, has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective immunity. **Infection and Immunity**, Washington, v. 74, n. 1, p. 694-702, 2006.

LI, Z. H.; MENOIRET, A.; SRIVASTAVA, P. Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 14, n. 1, p. 45-51, 2002.

LUONG, M. et al. Stimulation of TLR4 by recombinant HSP70 requires structural integrity of the HSP70 protein itself. **Journal of Inflammation**, New York, v. 9, n. 1, p. 11-16, Jan. 2012.

MACNAB, R. M. How bacteria assemble flagella. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 57, p. 77-100, May 2003.

MEANS, T. K.; GOLENBOCK, D. T.; FENTON, M. J. Structure and function of Toll-like receptor proteins. **Life Sciences**, Varsovia, v. 68, n. 3, p. 241-258, 2000.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 1, n. 2, p. 135-145, 2001.

METCALFE, H. J. et al. Flagellin expression enhances *Salmonella* accumulation in TLR5-positive macrophages. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 34, n. 8, p. 797-804, Aug. 2010.

MIYAJI, E. N. et al. Trends in adjuvant development for vaccines: DAMPs and PAMPs as potential new adjuvants. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 44, n. 6, p. 500-513, Dec. 2011.

MOSER, M.; LEO, O. Key concepts in immunology. **Vaccine**, Kidlington, v. 28, n. 3, p. 2-13, 2010. Supplement.

MUZIO, M.; MANTOVANI, A. Toll-like receptors. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, n. 3, p. 251-255, 2000.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in innate immunity and inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, New York, v. 4, n. 3, Mar. 2012. Disponível em: <<http://cshperspectives.cshlp.org/content/4/3/a006049.full>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

NOESSNER, E. et al. Tumor-derived heat shock protein 70 peptide complexes are cross-presented by human dendritic cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 169, n. 10, p. 5424-5432, Oct. 2002.

OHASHI, K. et al. Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 164, n. 2, p. 558-561, Feb. 2000.

O'NEILL, L. A. J. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor/Toll-like receptor superfamily. **Toll-Like Receptor Family Members and Their Ligands**, Oxford, n. 270, p. 47-61, 2002.

PASARE, C.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. **Microbes and Infection**, Paris, v. 6, n. 15, p. 1382-1387, 2004.

PAUL, M. S. et al. Prophylactic treatment with Toll-like receptor ligands enhances host immunity to avian influenza virus in chickens. **Vaccine**, Kidlington, v. 30, n. 30, p. 4524-4531, 2012.

POCKLEY, A. G. Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents? **Expert Reviews in Molecular Medicine**, Trenton, v. 23, p. 1-21, 2001.

PUTTEN, J. P. M. van; BOUWMAN, L. I.; DE ZOETE, M. R. Unraveling bacterial interactions with Toll-like receptors. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 128, n. 1, p. 8-11, Jan. 2010.

RAMOS, H. C.; RUMBO, M.; SIRARD, J. C. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 12, n. 11, 509-517, Nov. 2004.

RUAN, W.; WU, Y.; ZHENG, S. J. Different genetic patterns in avian Toll-like receptor (TLR) 5 genes. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 39, n. 4, p. 3419-3426, Apr. 2011.

SKOUNTZOU, I. et al. Salmonella flagellins are potent adjuvants for intranasally administered whole inactivated influenza vaccine. **Vaccine**, Kidlington, v. 28, n. 24, p. 4103-4112, May 2010.

SMITH, K. D. et al. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. **Nature Immunology**, New York, v. 5, n. 4, p. 1247-1251, Apr. 2004.

SOMERSAN, S. et al. Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 167, n. 9, p. 4844-4852, Nov. 2001.

STEWART, G. R. et al. Overexpression of heat-shock proteins reduces survival of Mycobacterium tuberculosis in the chronic phase of infection. **Nature Medicine**, New York, v. 7, n. 6, p. 732-737, Dec. 2001.

STEWART, G. R.; YOUNG, D. B. Heat-shock proteins and the host-pathogen interaction during bacterial infection. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 16, n. 4, p. 506-510, Apr. 2004.

SUZUKI, N. et al. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. **Nature**, London, v. 416, n. 6882, p. 750-754, 2002.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, Cambridge, v. 140, n. 6, p. 805-820, Mar. 2010.

TAPPING, R. I. Innate immune sensing and activation of cell surface Toll-like receptors. **Seminars in Immunology**, Philadelphia, v. 21, n. 4, p. 175-184, Aug. 2009.

TEMPERLEY, N. D. et al. Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family: a story of gene gain and gene loss. **BMC Genomics**, London, v. 9, n. 62, p. 62-66, Feb. 2008.

TOBIAN, A. A. et al. Bacterial heat shock proteins promote CD91-dependent class I MHC cross presentation of chaperoned peptide to CD8⁺ T cells by cytosolic mechanisms in dendritic cells versus vacuolar mechanisms in macrophages. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 172, n. 9, p. 5277-5286, May 2004.

TSAN, M. F.; GAO, B. Heat shock proteins and immune system. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 85, n. 6, p. 905-910, Dec. 2009.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Relatório anual: Ubabef**. São Paulo, 2012. 57 p.

VABULAS, R. M. et al. HSP70 as endogenous stimulus of the toll/interleukin-1 receptor signal pathway. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 17, p. 15107-15112, 2002.

VASSELON, T.; DETMERS, P. A. Toll receptors: a central element in innate immune responses. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 3, p. 1033-1041, 2002.

WALLIN, R. P. A. et al. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. **Trends in Immunology**, London, v. 23, n. 3, p. 130-135, 2002.

WERLING, D.; JUNGI, T. W. Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 91, n. 1, p. 91-103, Feb. 2003.

WU, Z.; KAISER, P. Antigen presenting cells in a non-mammalian model system, the chicken. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 216, n. 11, p. 1177-1183, Nov. 2011.

YONEKURA, K.; MAKI-YONEKURA, S.; NAMBA, K. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. **Nature**, London, v. 424, n. 6949, p. 643-650, Aug. 2003.

ZENG, H. et al. Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic Salmonella. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 171, n. 7, p. 3668-3674, Oct. 2003.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

ARTIGO 1 **Seleção, caracterização e clonagem dos genes fljB e groEL agonistas dos receptores de reconhecimento de padrão do sistema imune inato das aves**

Artigo formatado segundo as normas da *Journal of Animal Science*

**SELEÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E CLONAGEM DOS GENES
fljB E groEL AGONISTAS DOS RECEPTORES DE
RECONHECIMENTO DE PADRÃO DO SISTEMA IMUNE
INATO DAS AVES**

Resumo

A produção recombinante de agonistas dos receptores do reconhecimento de padrão do sistema imune inato tem fornecido uma nova ferramenta para a produção de imunostimulantes para animais. O padrão molecular associado ao patógeno (PAMP), flagelina, codificado pelo gene fljB da *S. Typhimurium* e o padrão molecular associado ao dano (DAMP) HSP60, codificado pelo gene groEL da *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (RRPs) do sistema imune inato das aves. No presente estudo, foi feita a clonagem de fragmentos genéticos dos genes fljB da *S. Typhimurium* e groEL da *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* inseridos no vetor de expressão pET100/D-TOPO e transformados em células de *E. coli* TO10. Os clones foram avaliados pela PCR de colônia, PCR de DNA plasmidial e sequenciamento genômico para a confirmação da presença desses genes. Na PCR de colônia, foram identificadas em 80%, 60% e 80% das colônias transformadas, a presença dos genes groEL (*S. Enteritidis*), groEL (*S. Typhimurium*) e fljB (*S. Typhimurium*) respectivamente. O sistema de clonagem adotado possibilitou a produção de clones dos fragmentos genéticos da HSP60 e flagelina das cepas de *Salmonella*, permitindo a utilização posterior desses clones em ensaios de expressão gênica, com potencial futuro de serem utilizados como imunostimulante inespecífico das aves.

Key-words: proteína recombinante, PAMP, flagelina, DAMP, HSP60.

**SELECTION, CHARACTERIZATION AND CLONING OF
THE fljB AND groEL GENES AGONISTS OF THE INNATE
IMMUNE SYSTEM PATTERN RECOGNITION RECEPTORS OF
BIRDS**

Abstract

The recombinant production of innate immune system pattern recognition receptor agonists has provided a new tool for the production of immunostimulants for animals. The molecular pattern associated to the pathogen (PAMP), flagelina, coded by the fljB gene from the *S. typhimurium*, and the molecular pattern associated to the damage (DAMP), HSP60, coded by the groEL gene from the *S. typhimurium* and *S. enteritidis*, are recognized by pattern recognition receptors (PRRs) of the innate immune system of birds. In the present study, we performed the cloning of genetic fragments of the genes fljB, from the *S. typhimurium*, and groEL from the *S. typhimurium* and *S. enteritidis* inserted in expression vector pET100/D-TOPO and transformed in *E. coli* TO10 cells. The clones were evaluated by colony PCR, plasmidial DNA PCR and genome sequencing in order to confirm the presence of these genes. In the colony PCR, we identified the presence of genes groEL (*S. enteritidis*), groEL (*S. typhimurium*) and fljB (*S. typhimurium*) in 80%, 60% and 80% of the transformed colonies, respectively. The cloning system adopted allowed the production of HSP60 genetic fragment clones and flagelina of *Salmonella* strains, allowing the posterior use of these

clones in gene expression trials, with the future potential of being used as non-specific immunostimulants for birds.

Keywords: recombinant protein, PAMP, flageline, DAMP, HSP60.

1 INTRODUÇÃO

A avicultura moderna é uma das fontes de produção de alimentos que tem grande impacto social e econômico no mundo. A sanidade dos plantéis avícolas é essencial para o abastecimento e a segurança alimentar dos mercados consumidores. Além disso, alguns patógenos aviários como o vírus da influenza aviária, *Salmonella* e *Campylobacter* causam de infecções zoonóticas (KAISER, 2010). Um dos métodos empregados na prevenção de enfermidades nas aves, a vacinação, é considerada a melhor estratégia com custo-benefício, para aumentar a saúde dos animais (AUCOUTURIER; DUPUIS; GANNE, 2001). Entretanto, alguns relatos da utilização de determinados tipos de vacinas aviárias evidenciaram a seleção de patógenos com maiores virulências, como o vírus da doença de Marek (GIMENO, 2008; NAIR, 2005). Desta forma, torna-se necessário o desenvolvimento de novos e melhores produtos imunoestimulantes que visam modular respostas protetoras eficazes nas aves.

O sistema imunológico das aves pode ser dividido em sistema inato e adaptativo (KAISER, 2010). O sistema imune inato é considerado a primeira linha de defesa do hospedeiro dado a capacidade de induzir uma resposta rápida e menos específica quando em contato com agentes invasores (MIYAJI et al., 2011). O reconhecimento dos patógenos na

imunidade inata é mediado pelos Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRPs) (JUUL-MADSEN et al., 2008). Esses receptores reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) compartilhados entre diferentes microorganismos infecciosos, e padrões moleculares associados aos danos (DAMPs) que são ligantes endógenos, muitas vezes referidos como “sinais de perigo” liberados durante o dano tecidual ocorrido em locais infecciosos e de necrose celular (DREXLER; FOXWELL, 2010; MOSER; LEO, 2010; TAKEUCHI; AKIRA, 2010; TAPING, 2009). A ativação dos RRP's leva a ativação de vias de sinalização intracelular que resulta em mecanismos microbicidas, produção de substâncias pro ou anti-inflamatórias, moléculas coestimulatórias de respostas efetoras do sistema imune inato e adaptativo (ADEREM; ULEVITCH, 2000; DALPKE; HEEG, 2002; JANEWAY; MEDZHITOV, 2002; KAWAI; AKIRA, 2011; KOGUT et al., 2005; KOGUT; HE; GENOVESE, 2012; O'NEILL, 2002).

Uma das principais famílias dos RRP's é a dos receptores *Toll-like* (TLRs) que exercem a função de discriminar os diferentes patógenos, principalmente pelo reconhecimento de PAMPs, e estão envolvidos em um sistema de sinalização que é conservado em mamíferos, aves, insetos e plantas (MEANS; GOLENBOCK; FENTON, 2000). Os DAMPs são detectados por diversos RRP's que ainda não são bem especificados (POCKLEY, 2001), embora alguns estudos referenciem o reconhecimento dessas moléculas por alguns TLRs (BIANCHI, 2007; STEWART; YOUNG, 2004).

Bactérias patogênicas flagelares expressa a flagelina para promover motilidade, colonização e invasão da mucosa (BONIFIELD; HUGHES, 2003). A flagelina exibe algumas características de PAMPs, incluindo sequência conservada, componente importante para o microrganismo, larga distribuição entre bactérias e capacidade de induzir o TLR5 (BERIN et al., 2002; HAYASHI et al., 2001; RAMOS; RUMBO; SIRARD, 2004; ZENG et al., 2003).

As proteínas de choque térmico (HSPs) são expressas constitutivamente em todas as células de mamíferos, aves, plantas e em microrganismo, e são classificadas como chaperoninas moleculares (WALLIN et al., 2002). HSPs microbianas possuem perfil imunoestimulante baseado no reconhecimento por receptores endocíticos, na internalização das células apresentadoras de antígenos, e na apresentação por via de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (TOBIAN et al., 2004; WALLIN et al., 2002). Outro fator apontado por alguns trabalhos é a capacidade de HSPs induzir a maturação fenotípica e funcional das APCs (NOESSNER et al., 2002; SOMERSAN et al., 2001; WALLIAN et al., 2002).

Diversos experimentos confirmam o potencial de flagelina (HULEATT et al., 2006; PINO; MARTIN; MICHALEK, 2005; SKOUNTZOV et al., 2010) e HSPs (HARMALA et al., 2006; PALIWAL et al., 2008, 2011) produzidas de forma recombinante na capacidade de atuar como imunoestimulantes do sistema imune dos mamíferos. Com isso, objetivou-se, com este trabalho selecionar, caracterizar e clonar transgenes codificadores de agonistas dos receptores de reconhecimento

de padrões do sistema imune inato em aves, visando posterior utilização como imunostimulante na produção avícola.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local

O experimento foi realizado na Universidade Federal de Lavras, sendo que a maior parte das atividades foi desenvolvida no Laboratório de Fisiologia Molecular Vegetal do Departamento de Biologia.

2.2. Análise *in silico*

Os agonistas dos receptores de reconhecimento de padrão para aves foram determinados e analisados quanto a sua sequência genética por meio de análise *in silico*.

A composição genômica da flagelina e da *HSP60* foi analisada por busca direta de sequências genômicas disponíveis no banco de dados da National Center for Biotechnology Information - NCBI (2012). Posteriormente, foi realizada a identificação de microorganismos que possuem a presença de tais agonistas.

2.3. Cultivo bacteriano

Os agonistas de escolha foram relatados em diversos patógenos microbianos, sendo que para esse experimento foram utilizadas cepas de *Salmonella* Typhimurium (ST) e *Salmonella* Enteritidis (SE). Foi

utilizado como meio de crescimento o meio *brain heart infusion* (Merck), BHI, que foi preparado conforme as recomendações do fabricante.

2.4. Desenho, síntese e utilização de iniciadores

Os iniciadores (*forward* e *reverse*) para flanquear as regiões do gene responsável por codificar a flagelina, gene *fljB*, foram retirados da literatura (Quadro 1). Em seguida, foi realizada a verificação dos iniciadores quanto à capacidade de reconhecer a sequência do gene alvo utilizando-se BLAST (Basic Local Alinhament Sequence Tool) (ALTSCHUL et al., 1990). Os pares de iniciadores para o gene codificador da HSP60, gene *groEL*, foram desenhados no software *PrimerQuest* (Quadro 1).

Quadro 1 Iniciadores para o gene *fljB* da *Salmonella* Typhimurium e gene *groEL* da *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*

Gene	Iniciador	Sequência (5' - 3')	Tamanho (pb)	Referência
<i>fljB</i>	<i>Forward</i>	ACGAATGGTACGGCTTCTG TAACC	526	Lim et al. (2003)
	<i>Reverse</i>	TACCGTCGATAGTAACGAC TTCGG		
<i>groEL</i>	<i>Forward</i>	TGAAAGGCCAGAACGAAGACCAG	209	Desenho do nesse ensaio
	<i>Reverse</i>	TTTGGTTGGGTCCAGGATAC CCAT		

O desenho dos iniciadores *forward* para a inserção dos fragmentos genéticos no vetor de clonagem pET100-TOPO® (*Invitrogen*) foi realizado conforme as especificações do fabricante (Quadro 2). Foi realizada a modificação dos iniciadores *forward* estabelecidos anteriormente, com adição *upstream* da sequência CACC na extremidade 5' do iniciador. Além dessa modificação, foi adicionada após a sequência CACC uma sequência ATG responsável na ligação do ribossomo no processo de tradução. Os iniciadores *reverse* não foram modificados devido a não complementariedade da sequência GTGG livre do vetor.

Quadro 2 Iniciadores *forward* de PCR com extremidades coesivas para inserção dos fragmentos genéticos no vetor de clonagem

Gene	Sequência no sentido 5' - 3'
<i>fljB</i>	CACCATGACGAATGGTACGGCTTCTGTAACC
<i>groel</i>	CACCATGTGAAAGGCCAGAACGAAGACCAGA

2.5. Extração do DNA total

Num primeiro momento foi extraído o DNA total das bactérias *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* para posterior amplificação dos fragmentos de genes selecionados. Para a extração do DNA total das amostras foi utilizado o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (*Promega*), seguindo as recomendações do fabricante.

A integridade do DNA foi avaliada em eletroforese de gel de agarose 1,2% corado com Gel Red™ 1x . As concentrações (ng/μl) também foram determinadas no espectrofotômetro NanoVue™ *plus*.

2.6. Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Os fragmentos de DNA desejados foram amplificados por PCR utilizando-se o DNA purificado anteriormente. Para cada gene de cada cepa bacteriana, foi padronizada uma reação de PCR.

2.6.1 Amplificação do gene *fljB* da *S. Typhimurium*

A reação foi constituída de 25X de tampão de PCR (100 mM Tris-HCl ph 8,4; 500 mM KCl); 75 mM de MgCl₂; 5 mM de dNTPs (ATP, TTP, CTP e GTP); 50 ng do DNA; 1,6 u da Taq DNA Polimerase; 5 mM

dos iniciadores *forward* e *reverse*; 14, 7 μ l de água deionizada autoclavada para completar um volume final de 25 μ l.

As condições para a reação foram: um passo de desnaturação a 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 1 minuto, anelamento de 65 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 30 segundos e extensão final a 72 °C por 7 min.

2.6.2. Amplificação do gene *groEL* da *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*

A reação foi constituída de 25X de tampão de PCR (100 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl); 62,5 u de MgCl₂; 5 mM de dNTPs (ATP, TTP, CTP e GTP); 120 ng do DNA; 1,6 u da Taq DNA Polimerase; 5 mM dos iniciadores *forward* e *reverse*; 13, 7 μ l de Água MiliQ autoclavada para completar um volume final de 25 μ l.

As condições para a reação foram: um passo de desnaturação a 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 1 min, anelamento de 62 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 7 min.

2.7. Eletroforese em gel de agarose

As amostras foram aplicadas em gel de agarose de alta resolução 1,5%, corado com Gel Red™ 1X, na voltagem de 120 volts em cuba de eletroforese horizontal, tendo TBE (Tris-borato 0,09 M e EDTA 0,002 M) como tampão de corrida. Com o auxílio de padrão de peso molecular com os tamanhos de 50, 150, 300, 500, 750 e 1000 pb foram identificadas as bandas de interesse.

2.8. Clonagem de Fragmentos com Extremidades Coesivas

A clonagem do DNA foi realizada por meio do vetor pET100/D-TOPO® (*Invitrogen*), que possui o promotor T7 que permite alto nível de expressão para proteínas recombinantes em *E. coli* competentes. No sistema TOPO® os produtos de PCR são direcionalmente clonados pela adição de quatro bases no primer *forward* (CACC) que hibridiza com as bases da saliência livre do vetor de clonagem (GTGG) estabilizando o produto de PCR para o direcionamento da clonagem na orientação correta.

O primeiro passo da clonagem foi o da produção de produtos de PCR com extremidades coesivas pela reação de PCR com uma DNA polimerase com atividade revisora, a Pfx50™ (*Invitrogen*). Posteriormente foi realizada a ligação do produto de PCR com extremidade coesiva ao vetor de clonagem pET100/D-TOPO® (*Invitrogen*) seguindo as recomendações do fabricante.

Em seguida, realizou-se a reação de transformação da clonagem em células de *E. coli* competentes TOP10 (*Invitrogen*) pelo método de transformação química seguindo as especificações do fabricante. Alíquotas de 100 e 200 µl de cada reação de transformação da clonagem foram semeadas em placas pré-aquecidas de LB (*Merck*) com ampicilina (50 µg/ml), e foram incubadas durante a noite a 37 °C.

Para a análise dos transformantes, foram escolhidas dez colônias do crescimento anterior. As colônias individuais foram retiradas da placa, depositadas em um tubo de (0,2 ml) para PCR e em seguida cultivadas em

3 ml de LB líquido com ampicilina (50 µg/ml) em estufa a 37 °C a 200 rpm por 24 h.

As reações de PCR de colônia foram padronizadas conforme as reações de PCR estabelecidas inicialmente na identificação dos fragmentos genéticos nas cepas bacterianas.

A próxima etapa consistiu na extração do DNA plasmidial do cultivo bacteriano. Foi utilizado o kit *PureLink™ HQ Mini Kit Plasmid Purification (Invitrogen)* seguindo as recomendações do fabricante. Após a obtenção do DNA plasmidial, foram realizadas a determinação das concentrações (ng/µl) do DNA plasmidial no espectrofotômetro NanoVue™ plus, e outra PCR com esse DNA para confirmar as amostras positivas para o vetor com o inserto dos fragmentos genéticos desejados.

2.9. Sequenciamento

Os fragmentos dos genes amplificados na PCR e visualizadas na eletroforese em gel de agarose foram purificados utilizando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®)* de acordo com as especificações do fabricante. Posteriormente, esses fragmentos foram submetidos ao sequenciamento genético no sequenciador automático capilar ABI310 (Applied Biosystems) pelo método enzimático descrito por Sanger, Nicklen e Coulson (1977) no Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da UFMG. As amostras de DNA plasmidial foram sequenciadas com o mesmo método.

As sequências geradas foram comparadas com as sequências dos fragmentos dos genes disponíveis no banco de dados do NCBI (2012) e

com a sequência do vetor de clonagem disponível pelo fornecedor (*Invitrogen*). Os algoritmos BLASTn e BLASTx (BASIC ALIGNMENT SEARCH TOOL - BLAST, 2012) do pacote BLAST 2.0 (*Basic Alignment Search Tool*) disponibilizado pelo NCBI foram utilizados para a busca de similaridade entre os nucleotídeos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise *in silico* das sequências dos agonistas

No presente trabalho, o PAMP flagelina da *S. Typhimurium*, codificada pelo gene *fljB*, foi escolhida devido seu potencial de ativação de um membro do grupo dos TLRs, o TLR5 (METCALFE et al., 2010; RAMOS; RUMBO; SIRARD, 2004; PUTTEN; BOUWMAN; DE ZOETE, 2010). Com o objetivo de trabalhar com agonistas com atividades DAMP que possuem capacidade de ativar receptores ainda não bem especificados na literatura, foi escolhida a HSP60 das cepas *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, ambas codificadas pelo gene *groEL* (ENSGRABER; LOOS, 1992; NAIR et al., 2002; RAINCZAK et al., 2011).

O alinhamento das sequências amplificadas pelos conjuntos de iniciadores para o gene *fljB*, e dos genes *groEL*, provou 100% de identidade na análise *in silico* realizada no banco de dados do NCBI. Os números de acesso foram NC_016860.1, NC_011294.1 e FN424405.1, respectivamente para os genes *fljB* (*S. Typhimurium*), *groEL* (*S. Enteritidis*), *groEL* (*S. Typhimurium*). Lim et al. (2003) utilizam os mesmos iniciadores para a identificação do gene *fljB* em cepas de *S.*

Typhimurium em um protocolo de PCR para a detecção específica desse sorovar.

A identidade do gene groEL entre as duas cepas bacterianas utilizadas foi de 99,03%, o que permitiu a utilização dos mesmos iniciadores para amplificar fragmentos desse gene com as duas diferentes amostras de DNA genômico na PCR. A proteína de choque térmico dos sorovares da *Salmonella* sp., codificadas pelo gene groEL são altamente conservadas. O gene groEL pode ser usado como marcador geral filogenético, e estudos comparativos da sequência desse gene entre diferentes espécies de patógenos mostram a alta variabilidade nas suas sequências, o que favorece a sua análise genética para a diferenciação de espécies (HU et al., 2010). No nosso estudo, a avaliação *in silico* confirmou a alta similaridade entre esse DAMP dos dois sorovares, o que justificou a utilização de um mesmo iniciador para amplificação desse gene na PCR.

3.2. PCR para genes agonistas de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*

O tamanho dos fragmentos amplificados do gene groEL da *S. Enteritidis*, gene groEL e fljB da *S. Typhimurium* foram 209 pb, 209 pb e 526 pb respectivamente (Figura 1). Esses resultados da PCR corroboram com a alta especificidade dos iniciadores para a amplificação desses genes. O sequenciamento dos produtos de PCR confirmaram a identidade dos *amplicons* com os genes groEL e fljB. Dilmaghani et al. (2011) visualizaram produtos de PCR do gene fljB na eletroforese em gel de agarose com os mesmos tamanhos encontrados nesse estudo, confirmando a presença desse gene nas amostras provenientes de *S.*

Typhimurium. Stefaniak et al. (2011) adotaram iniciadores para o gene groEL da *S. Enteritidis* que produziram amplicons de 1600 pb para posterior inserção em vetores de clonagem. Em nosso estudo, a produção de amplicons de 209 pares de base para esses genes de ambas as cepas foi devido à possibilidade de avaliar em estágios futuros, a expressão desses fragmentos genéticos e a capacidade de pequenos peptídeos representantes da HSP60 estimularem o sistema imune inato.

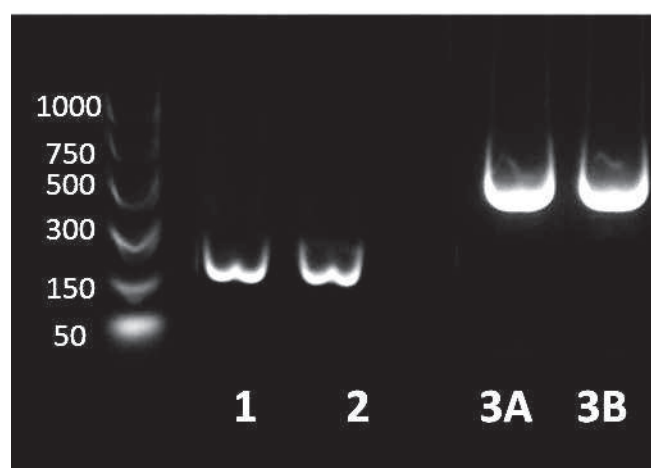


Figura 1 Eletroforese em gel de agarose com os produtos de PCR dos genes agonistas

Nota: À esquerda, o marcador molecular de 50 a 1000 pb; 1: gene groEL da *S. Enteritidis* (209 pb); 2: gene groEL da *S. Typhimurium* (209 pb); 3: gene fljB da *S. Typhimurium* (526 pb).

3.3. Produção de produtos de PCR com extremidades coesivas para inserção no vetor de clonagem pET100/D-TOPO

Posteriormente, na reação de produção de produtos de PCR com extremidades coesivas para inserção no vetor de clonagem pET100/D-TOPO, o resultado da eletroforese em gel de agarose mostrou as bandas

esperadas com os tamanhos próximos aos dos genes, gene *fljB* da *S. Typhimurium* com 533 pb e genes *groEL* das duas cepas com 216 pb (Figura 2).

Diversos trabalhos que têm por ferramenta a clonagem de genes imunoestimulantes fizeram a produção de produtos de PCR para inserção nos plasmídeos de clonagem, adequando às especificidades dos vetores utilizados (PALIWAL et al., 2011; RAINCZAK et al., 2011; SKOUNTZOV et al., 2010). Esse é o primeiro trabalho com a adoção do pET100/D-TOPO para clonagem de genes bacterianos agonistas do sistema imunológico. Mazur et al. (2010) realizaram a clonagem do antígeno p24 do capsídeo do vírus da imunodeficiência felina com adoção do pET100/D-TOPO. Esses pesquisadores adotaram as mesmas especificações utilizadas em nosso ensaio para a geração de produtos de PCR com extremidades coesivas, como a adição CACC nos iniciadores *forward* e utilização da DNA polimerase de alta fidelidade, que posteriormente permitiu a inserção desses fragmentos na orientação correta nos plasmídeos.

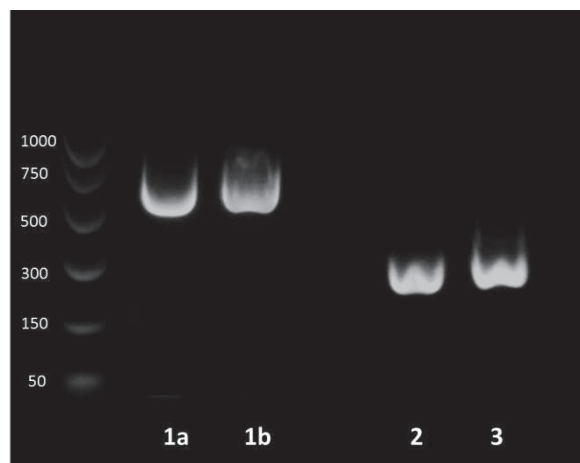


Figura 2 Eletroforese em gel de agarose com os produtos de PCR com extremidades coesivas para inserção no vetor de clonagem

Nota: À esquerda o marcador molecular de 50 a 1000 pb; 1a e 1b: gene fljB (533 pb); 2: gene groEL da *S. Typhimurium* (216 pb); 3: gene groEL da *S. Enteritidis* (216 pb).

3.4. Confirmação da presença do inserto em colônias de *E. coli* competentes pela PCR de colônia e sequenciamento genético

Foi detectado o crescimento de colônias de *E. coli* TOP10 no meio sólido, após a reação de transformação da clonagem pelo método de transformação química. O total de 10 colônias desse crescimento foi escolhido aleatoriamente para cada fragmento genético, e analisadas quanto à presença do inserto pela técnica da PCR de colônia. Tal técnica demonstrou a presença em 8 colônias com o fragmento do gene groEL em *S. Enteritidis*, 6 com o gene groEL em *S. Typhimurium* e 8 com o gene fljB da *S. Typhimurium* (Figura 3). Resultados similares foram encontrados por Zhi-Hua, Yang e Nie (2006) que clonaram um gene codificante de um tipo de HSP, e utilizaram a reação de PCR de colônia para confirmar os clones com a presença do gene desejado. Seron, Hill e

Linsler (2000) utilizaram o mesmo sistema de clonagem do presente estudo para o gene da anidrase carbônica, entretanto a confirmação da presença do gene nos clones foi realizada pelo sequenciamento direto das colônias. Ainda foi realizada a confirmação do inserto no DNA plasmidial e sequenciamento genético.



Figura 3 Eletroforese em gel de agarose com os produtos de PCR das colônias que receberam o vetor de clonagem com o inserto dos fragmentos dos genes

Nota: À esquerda o marcador molecular; 1 a 10 gene groEL (216 pb) da *S. Enteritidis*. 11 a 19: gene groEL (216 pb) da *S.Typhimurium*. (+) colônias com o inserto desejado; (-) colônias com ausência do inserto.

As colônias positivas na técnica de PCR de colônia foram submetidas ao crescimento em meio líquido, e posteriormente o DNA plasmidial extraído dessas colônias foram avaliadas quanto à presença do inserto clonado pela PCR. Barbosa et al. (2006), visando a clonagem do gene responsável por codificar o antígeno GAPDH do patógeno *Paracoccidioides brasiliensis* utilizaram o mesmo vetor e confirmaram a presença do inserto nos transformantes pela PCR com o DNA plasmidial, e prosseguiram para a expressão desse gene em *E. coli*, obtendo a produção recombinante dessa proteína.

Apenas as amostras de DNA plasmidial que apresentaram a visualização das bandas dos amplicons com os tamanhos esperados na eletroforese em gel de agarose, foram submetidas ao sequenciamento genômico (Figura 4). O sequenciamento confirmou a presença dos fragmentos genéticos na direção correta, das amostras de DNA plasmidial.

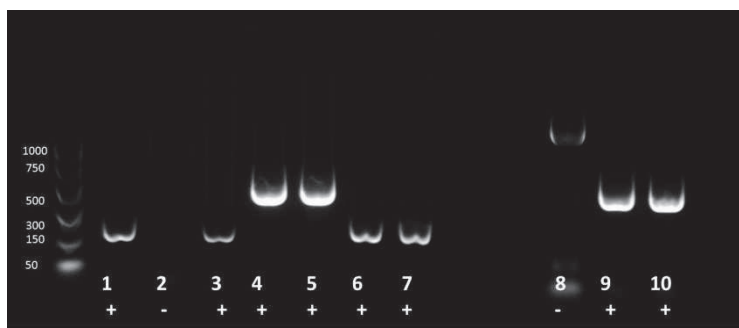


Figura 4 Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR com o DNA plasmidial proveniente do cultivo de colônias positivas na PCR de colônia

Nota: À esquerda o marcador molecular de 50 a 1000 pb; 1 a 3: gene *groEL* (526 pb) da *S. Enteritidis*; 4, 5, 9 e 10: gene *fljB* da *S. Typhimurium*; 6,7,8: gene *groEL* da *S. Typhimurium*. (+): amostras com amplicons dos tamanhos esperados; (-) ausência de amplicons ou amplicons inespecíficos.

Diante dos resultados obtidos, o processo de clonagem dos fragmentos genéticos agonistas dos RRP's provenientes de ambas as cepas resultou em amostras de DNA plasmidial com os vetores e insertos na direção correta para a introdução em células de *E. coli* de expressão. Expectativas futuras da expressão desses genes e avaliação da resposta imune aviária, mediada pela inoculação desses peptídeos são baseadas nos testes *in vitro* e *in vivo* para genes imunostimulantes em mamíferos.

O gene groEL da *S. Typhi* foi clonado e expresso em hospedeiro heterólogo por Paliwal et al. (2008). Tais pesquisadores adotaram metodologia de cultivo bacteriano, obtenção de DNA genômico e clonagem similares ao do nosso estudo. Posteriormente à expressão da HSP60, foi realizada a inoculação dessa proteína isolada, e em conjunto com um desafio bacterino em camundongos. A administração individual desse DAMP recombinante levou a produção de maiores níveis de interleucinas e respostas humorais, o que demonstrou a possibilidade dessas proteínas atuarem tanto como moléculas de reconhecimento das respostas imunes inatas e como antígenos bacterianos capazes de gerar respostas imunes adaptativas. Posteriormente, a co-administração da HSP60 com a *S. Typhimurium* detectou o aumento da produção dos títulos de anticorpos da classe IgG, além dos níveis mais elevados de IL-4 e IFN- γ . Esses achados endossam os estudos da utilização de HSPs recombinantes como candidatos imunoestimulantes inespecíficos e vacinais.

Diversas pesquisas reforçam o potencial imunoestimulante da flagelina. A inoculação *in vivo* desse PAMP, endereçada a sítios como o trato respiratório, resultou no recrutamento de citocinas e moléculas inflamatórias para esses locais (HONKO; MIZEL, 2004). O trabalho desenvolvido por Skountzov et al. (2010) mostrou a eficiência da flagelina recombinante codificada pelo gene fliC da *S. Typhimurium* no estímulo das respostas imunológicas em camundongos. Nesse estudo, a clonagem do gene fliC em vetores apropriados, permitiu a expressão em células bacterianas de *E. coli* e purificação dessas proteínas para inoculação intranasal associadas com uma vacina inativada para gripe

aviária. Resultados superiores foram encontrados em comparação ao grupo de animais que não receberam a administração de flagelina, como aumento da porcentagem de células inatas recrutadas, maior expressão de TLR5, aumento de citocinas (IFN- γ e TNF- α) e das respostas imunes humorais, além da indução da resposta imune celular com perfil Th2.

A inoculação *in vivo* do gene *fliC* em aves foram testados recentemente por Chaung et al. (2012) que administraram a flagelina recombinante concomitante com a vacina inativada da gripe aviária, e obtiveram respostas semelhantes aos resultados obtidos por Skountzov et al. (2010) em camundongos, além da otimização das respostas imunes humorais de mucosa e a detecção inesperada da expressão dos TLR3 em células mononucleares periféricas.

Existem poucos trabalhos que esclarecem as atividades imunoestimulantes do outro gene responsável por condicionar a flagelina, o *fljB*. Pino, Martin e Michalek (2005) evidenciaram que o gene *fljB* recombinante, co-administrado com antígenos provenientes de *Streptococcus mutans* em camundongos, levaram as células apresentadoras de antígenos a apresentarem maior expressão de moléculas coestimulatórias (B7-1 e B7-2), que contribuíram no aumento das respostas do tipo Th1 e Th2. Também foi demonstrado que esse gene flagelar tem a capacidade de aumentar tanto as respostas imunitárias humorais sistêmicas como de mucosa, favorecendo sua aplicabilidade como adjuvante.

O foco desse ensaio foi iniciar a produção recombinante do PAMP *fljB* e do DAMP HSP60, uma vez que não existem trabalhos visando esse objetivo com genes provenientes do gênero *Salmonella* e como alvo o

sistema imune inato das aves. As propriedades imunológicas, mencionadas por vários grupos de pesquisa em hospedeiros mamíferos, favorecem a produção recombinante e a possível aplicação desses peptídeos como imunoestimulante inespecífico para aves.

4 CONCLUSÃO

Em consonância com a tecnologia do DNA recombinante, as etapas procedidas nesse experimento, como a análise *in silico* dos genes e a clonagem são cruciais para a expressão dessas proteínas e avaliação da resposta imune no hospedeiro. Desta forma, concluímos que o sistema de clonagem utilizado neste experimento foi capaz de gerar clones aos fragmentos genéticos das HSP60 e flagelina, possibilitando a utilização posterior dos produtos gerados na expressão heteróloga desses genes agonistas.

REFERÊNCIAS

ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, London, v. 406, n. 6797, p. 782-787, Aug. 2000.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 5, p. 403-101, 1990.

AUCOUTURIER, J.; DUPUIS, L.; GANNE, V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. **Vaccine**, Kidlington, v. 19, n. 17/19, p. 2666-2672, 2001.

BARBOSA, M. S. et al. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *aracocidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 74, n. 1, p. 382-389, 2006.

BASIC ALIGNMENT SEARCH TOOL. **BLAST assembled refseq genomes**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

BERIN, M. C. et al. Role of EHEC O157: H7 virulence factors in the activation of intestinal epithelial cell NF-kappa B and MAP kinase pathways and the upregulated expression of interleukin 8. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 4, n. 10, p. 635-648, Oct. 2002.

BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 81, n. 1, p. 1-5, 2007.

BONIFIELD, H. R.; HUGHES, K. T. Flagellar phase variation in *Salmonella enterica* is mediated by a posttranscriptional control mechanism. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, n. 12, p. 3567-3574, 2003.

CHAUNG, H. C. et al. Salmonella flagellin enhances mucosal immunity of avian influenza vaccine in chickens. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 157, n. 1/2, p. 69-77, 2012.

DALPKE, A.; HEEG, K. Signal integration following toll-like receptor triggering. **Critical Reviews in Immunology**, Boca Raton, v. 22, n. 3, p. 217-250, 2002.

DILMAGHANI, M. et al. The analysis of groEL gene in Salmonella enterica subspecies enterica serovar Typhimurium isolated from avians by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism method. **Veterinary Research Community**, Pretoria, v. 35, p. 133-143, 2011.

DREXLER, S. K.; FOXWELL, B. M. The role of toll-like receptors in chronic inflammation. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 42, n. 4, p. 506-518, Apr. 2010.

ENSGRABER, M.; LOOS, M. A 66 Kilodalton heat-shock protein of salmonella-typhimurium is responsible for binding of the bacterium to intestinal mucus. **Infection and Immunity**, Washington, v. 60, n. 8, p. 3072-3078, Aug. 1992.

GIMENO, I. M. Marek's disease vaccines: a solution for today but a worry for tomorrow? **Vaccine**, Kidlington, v. 26, n. 3, p. C31-C41, July 2008. Supplement.

HARMALA, L. A. E. et al. The adjuvant effects of Mycobacterium tuberculosis heat shock protein 70 result from the rapid and prolonged activation of antigen-specific CD8(+) T cells in vivo. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 169, n. 10, p. 5622-5629, Oct. 2002.

HAYASHI, F. et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. **Nature**, London, v. 410, n. 6832, p. 1099-1103, Apr. 2001.

HONKO, A. N.; MIZEL, S. B. Mucosal administration of flagellin induces innate immunity in the mouse lung. **Infection and Immunity**, Washington, v. 72, n. 11, p. 6676-6679, Nov. 2004.

HU, Y. et al. Sequence analysis of the groEL gene and its potential application in identification of pathogenic bacteria. **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 4, n. 16, p. 1733-1741, 2010.

HULEATT, J. W. et al. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. **Vaccine**, Kidlington, v. 25, n. 4, p. 763-775, 2007.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 20, p. 197-216, Oct. 2002.

JUUL-MADSEN, H. R. et al. Avian innate immune responses. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K. A. (Ed.). **Avian immunology**. London: Academic, 2008. p. 129-158.

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

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, Cambridge, v. 34, n. 5, p. 637-650, May 2011.

KOGUT, M. H. et al. Expression and function of Toll-like receptors in chicken heterophils. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 29, n. 9, p. 791-807, Sept. 2005.

KOGUT, M. H.; HE, H.; GENOVESE, K. J. Bacterial toll-like receptor agonists induce sequential NF-kappa B-mediated leukotriene B-4 and prostaglandin E-2 production in chicken heterophils. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 145, n. 1/2, p. 159-170, Jan. 2012.

LIM, Y. H. et al. Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of Salmonella enterica serovar Typhimurium. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, Tokyo, v. 56, p. 151-155, 2003.

MAZUR, C. et al. Evaluation of a recombinant p24 antigen for the detection of feline immunodeficiency virus-specific antibodies. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 10, p. 877-880, out. 2010.

MEANS, T. K.; GOLENBOCK, D. T.; FENTON, M. J. Structure and function of Toll-like receptor proteins. **Life Sciences**, Varsovia, v. 68, n. 3, p. 241-258, 2000.

METCALFE, H. J. et al. Flagellin expression enhances Salmonella accumulation in TLR5-positive macrophages. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 34, n. 8, p. 797-804, Aug. 2010.

MIYAJI, E. N. et al. Trends in adjuvant development for vaccines: DAMPs and PAMPs as potential new adjuvants. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 44, n. 6, p. 500-513, Dec. 2011.

MOSER, M.; LEO, O. Key concepts in immunology. **Vaccine**, Kidlington, v. 28, n. 3, p. 2-13, Aug. 2010. Supplement.

NAIR, S. et al. Characterization of Salmonella serovars by PCR-single-strand conformation polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 7, p. 2346-2351, July 2002.

NAIR, V. Evolution of Marek's disease: a paradigm for incessant race between the pathogen and the host. **Veterinary Journal**, London, v. 170, n. 2, p. 175-183, Apr. 2005.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

NOESSNER, E. et al. Tumor-derived heat shock protein 70 peptide complexes are cross-presented by human dendritic cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 169, n. 10, p. 5424-5432, Nov. 2002.

O'NEILL, L. A. J. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor/Toll-like receptor superfamily. **Toll-Like Receptor Family Members and Their Ligands**, Oxford, n. 270, p. 47-61, 2002.

PALIWAL, P. K. et al. Cloning, expression and characterization of heat shock protein 60 (groEL) of *Salmonella enterica* serovar Typhi and its role in protective immunity against lethal *Salmonella* infection in mice. **Clinical Immunology**, Orlando, v. 126, n. 1, p. 89-96, Jan. 2008.

_____. Intraperitoneal immunization of recombinant HSP70 (DnaK) of *Salmonella* Typhi induces a predominant Th2 response and protective immunity in mice against lethal *Salmonella* infection. **Vaccine**, Kidlington, v. 29, n. 38, p. 6532-6539, 2011.

PINO, O.; MARTIN, M.; MICHALEK, S. M. Cellular mechanisms of the adjuvant activity of the flagellin component FljB of *Salmonella enterica* serovar typhimurium to potentiate mucosal and systemic responses. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 10, p. 6763-6770, Oct. 2005.

POCKLEY, A. G. Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents? **Expert Reviews in Molecular Medicine**, Trenton, v. 23, n. 1, p. 1-21, Mar. 2001.

PUTTEN, J. P. M. van; BOUWMAN, L. I.; DE ZOETE, M. R. Unraveling bacterial interactions with Toll-like receptors. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 128, n. 1, p. 8-11, Jan. 2010.

RAINCZAK, K. et al. Optimization of *Salmonella* Enteritidis recombinant heat shock protein 60 production. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, Olsztyn-Kortowo, v. 14, n. 1, p. 145-146, Jan. 2011.

RAMOS, H. C.; RUMBO, M.; SIRARD, J. C. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 12, n. 11, p. 507-517, Nov. 2004.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Biotechnology**, Frankfurt, v. 24, p. 104-108, 1977.

SERON, T. J.; HILL, J.; LINSER, P. J. A GPI-linked carbonic anhydrase expressed in the larval mosquito midgut. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 207, n. 26, p. 4559-4572, 2004.

SKOUNTZOU, I. et al. Salmonella flagellins are potent adjuvants for intranasally administered whole inactivated influenza vaccine. **Vaccine**, Kidlington, v. 28, n. 24, p. 4103-4112, Dec. 2010.

SOMERSAN, S. et al. Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 167, n. 9, p. 4844-4852, Nov. 2001.

STEFANIAK, T. et al. Optimization of Salmonella Enteritidis recombinant heat shock protein 60 production. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, Olsztyn-Kortowo, v. 14, n. 1, p. 145-149, Feb. 2011.

STEWART, G. R.; YOUNG, D. B. Heat-shock proteins and the host-pathogen interaction during bacterial infection. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 16, n. 4, p. 506-510, Apr. 2004.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, Cambridge, v. 140, n. 6, p. 805-820, June 2010.

TAPPING, R. I. Innate immune sensing and activation of cell surface Toll-like receptors. **Seminars in Immunology**, Philadelphia, v. 21, n. 4, p. 175-184, Aug. 2009.

TOBIAN, A. A. et al. Bacterial heat shock proteins promote CD91-dependent class I MHC cross presentation of chaperoned peptide to CD8+ T cells by cytosolic mechanisms in dendritic cells versus vacuolar mechanisms in macrophages. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 172, n. 9, p. 5277-5286, May 2004.

WALLIN, R. P. A. et al. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. **Trends in Immunology**, London, v. 23, n. 3, p. 130-135, 2002.

ZENG, H. et al. Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic Salmonella. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 171, n. 7, p. 3668-3674, Oct. 2003.

ZHI-HUA, L.; YANG, Q.; NIE, Y. Cloning and expression of *Hsp22.4* gene from *Chaetomium globosum*. **Journal of Forestry Research**, London, v. 17, n. 3, p. 259-262, Sept. 2006.