



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MIRIELE CAROLINE DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM LINHAGENS DE
GALINHAS POEDEIRAS E FRANGOS DE CORTE**

Londrina
2013

MIRIELE CAROLINE DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM LINHAGENS DE
GALINHAS POEDEIRAS E FRANGOS DE CORTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Emerson José Venancio
Co-orientador: Dr. Wagner Loyola

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S586a Silva, Miriele Caroline da.
Avaliação da resposta imune em linhagens de galinhas poedeiras e frangos de corte / Miriele Caroline da Silva. – Londrina, 2013.
84 f. : il.

Orientador: Emerson José Venâncio.
Coorientador: Wagner Loyola.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Linhagem (Genética) – Seleção – Teses. 2. Ave – Teses. 3. Resposta imune – Teses. 4. Macrófagos – Teses. 5. Imunoglobulinas – Teses. I. Venâncio, Emerson José. II. Loyola, Wagner. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 616-092

MIRIELE CAROLINE DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE EM LINHAGENS DE GALINHAS
POEDEIRAS E FRANGOS DE CORTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Emerson José Venâncio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Mário Augusto Ono
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Pesquisadora Dra. Jane de Oliveira Peixoto
EMBRAPA Suínos e Aves

Londrina, 09 de outubro de 2013.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pela luz que tem guiado meus passos e por permitir que eu chegasse até aqui.

À minha mãe, por sua compreensão e paciência comigo durante esses anos, e por tudo que tem feito por mim.

À minha irmã Franciele e minhas sobrinhas Melissa e Milena, pelo amor e pelo carinho.

Ao meu orientador professor Dr. Emerson José Venancio, pela oportunidade, por tudo que me ensinou e por contribuir com meu crescimento profissional.

Ao meu co-orientador Dr. Wagner Loyola, pela atenção e ajuda quando precisei.

À professora Dra. Ivete Conchon Costa, por sua colaboração nos experimentos com macrófagos.

Ao professor Dr. Gerson Nakazato e à professora Dra. Renata Kobayashi, pela colaboração nos experimentos da atividade antimicrobiana.

Ao professor Dr. João Wayne Pinheiro, pelo auxílio com os animais.

Ao professor Dr. Silvano Costa, pela ajuda com as análises estatísticas.

Aos amigos do laboratório Ana Paula Cheirubim, Michele Pagliari Montini, Sandmary Dechechi Chambó, Ana Carolina Navarro Ferraro, Eduardo Vignoto Fernandes, Marco Aurélio Chiara Silva, Denise Turini Gonzales Marioto, Amanda Fáveri Pitz, Fabiano Cardoso, Mayara Almeida e Karla Ferraz, por serem grandes companheiros, por muito me ajudarem, por tornarem os dias mais agradáveis e pelos bons momentos que passamos juntos.

À EMBRAPA Suínos e Aves pelo fornecimento dos animais.

À Fundação Araucária pela bolsa concedida.

A todos que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho.

Silva, Miriele Caroline da. **Avaliação da resposta imune em linhagens de galinhas poedeiras e frangos de corte**. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

O aumento da produção na avicultura tem sido favorecido pelo desenvolvimento de linhagens de aves mais produtivas. A maioria das características de produção depende de gasto energético que também é importante para o desenvolvimento da resposta imune. Assim a seleção para uma determinada característica pode influenciar a resposta imune das aves. Apesar da existência de diversas medidas de controle de doenças aviárias, existe o risco de surtos de doenças, trazendo prejuízos para a avicultura. Desse modo, o desenvolvimento de linhagens de aves mais resistentes a doenças é de grande importância. No Brasil, a EMBRAPA Suínos e Aves tem trabalhado no desenvolvimento de linhagens de galinhas poedeira e frangos de corte selecionadas para melhor produção, porém são poucos os estudos sobre o sistema imune destes animais. O objetivo deste trabalho foi comparar a resposta imune de linhagens de galinhas desenvolvidas pela EMBRAPA Suínos e Aves. Foram utilizados 140 animais, 70 machos e 70 fêmeas, sendo 28 animais da linhagem MM, 28 animais da linhagem CC, 28 animais da linhagem CCc, 28 animais da linhagem TT e 28 da linhagem LLc. Para avaliação da imunidade inata, os animais receberam uma injeção intra-abdominal de Sephadex a 3%. Após dois dias, os animais foram pesados e os macrófagos abdominais foram coletados e processados para a avaliação da fagocitose, produção de óxido nítrico e atividade antimicrobiana. Além disso, após o abate dos animais, os baços foram retirados e os seus pesos relativos determinados. E ainda, a medida dos halos de inibição de crescimento bacteriano e teste de resistência sérica foram utilizados para avaliação da atividade antibacteriana do soro. A imunidade humoral foi avaliada pela produção de anticorpos naturais anti-hemácia de coelho e pela indução de anticorpos específicos anti-hemácia de carneiro utilizando a técnica de microhemaglutinação. Os resultados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. Para diferenças entre machos e fêmeas da mesma linhagem foi utilizado o teste de Mann-Whitney, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Para a análise da atividade antibacteriana do soro em ágar foi aplicado o teste de regressão logística. Os resultados mostram que a atividade fagocítica e antibacteriana de macrófagos são semelhantes nas linhagens estudadas, porém a produção de NO é maior em frangos de corte. O peso relativo do baço foi maior nas linhagens de postura, e entre elas a linhagem MM foi maior que a CCc. Quanto à atividade antibacteriana do soro em ágar não foi encontrado diferença significativa, mas no teste de resistência sérica galinhas poedeiras responderam melhor que frangos de corte. Entre os animais de postura, machos responderam melhor no início do teste de resistência sérica, porém ao final do experimento as fêmeas tiveram melhor resposta que os machos da mesma linhagem e em frangos de corte, os machos responderam melhor que as fêmeas. Os títulos de anticorpos específicos e naturais foram maiores nas galinhas poedeiras e entre essas, as aves da linhagem CC e CCc produzem mais anticorpos. Esses dados permitem concluir que a resposta imune é melhor em aves de postura, o que sugere que a seleção genética pode influenciar a imunidade em aves. A identificação de características genéticas favoráveis pode

contribuir para o melhor entendimento da resposta imune em aves e com o desenvolvimento linhagens mais resistentes a patógenos.

Palavras-chave: Seleção genética. Aves. Macrófagos. Anticorpos naturais. Anticorpos específicos.

Silva, Miriele Caroline da. **Evaluation of immune response in lines of layers chickens and broilers.** 2013. 84 f. Dissertation (Master's Degree in Experimental Pathology) – State University of Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

The increase in poultry production has been favored by the development of more productive lines of birds. Most of the production traits depends on the energy expenditure than is also important for the development of the immune response. Thus selection for a particular trait can influence the immune response in poultry. Despite the existence of various control measures of poultry diseases, there is the risk of disease outbreaks, causing losses to the poultry industry. Thus, the development of lines of birds more resistant to diseases is of great importance. In Brazil, the Embrapa Swine and Poultry has been working on developing lines of layer chickens and broilers selected for best production, but there are few studies about the immune system of these animals. The goal of this study was to compare the immune response of lines of chickens developed by Embrapa Swine and Poultry. Were used 140 animals, 70 males and 70 females, 28 MM line animals, 28 CC line animals, 28 CCc line animals, 28 TT line animals and 28 LLc line animals. For evaluation of innate immunity, the animals received an intra-abdominal injection of Sephadex to 3%. After two days, the animals were weighed and the abdominal macrophages were collected and processed for the evaluation of phagocytosis, production of nitric oxide and antimicrobial activity. Additionally, after the slaughter of animals, the spleens were removed and their relative weights determined. And yet, the measures of inhibition halo of inhibition of bacterial growth and serum resistance test were used to evaluate the antibacterial activity of the serum. Humoral immunity was evaluate by the production of natural anti- rabbit red blood cells antibodies and for the induction of specific anti-sheep red blood cells antibodies using the technique of microhemaglutinação. The results were submitted to the Kruskal - Wallis test followed by Dunn's test. For differences between males and females of the same line was used the Mann -Whitney test, p values $< 0,05$ were considered significant. For the analysis of the antibacterial activity of the serum agar was applied logistic regression test. The results show that the phagocytic activity of macrophages and antibacterial are similar in the lines studied, but NO production is higher in broilers. The relative weight of the spleen was higher in layers lines, and between them MM line was higher than the CCc. As for the antibacterial activity of the serum agar was not found significant difference, but in the serum resistance test layers chickens responded better than broilers. Among the layer animals, males responded better early in the serum resistance test, but at the end of the experiment the females had better response than males of the same line and in broiler, males responded better than females. The titers of natural and specific antibodies were higher in layers chickens and among these, the birds of the CC and CCc lines produce more antibodies. These data showed that the immune response is better in layers chickens, suggesting that genetic selection can influence immunity in birds. The identification of favorable genetic traits can contribute to a better understanding of the immune response in birds and developing lines more resistant to pathogens.

Key words: Genetic selection. Birds. Macrophages. Natural antibodies. Specific antibodies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Atividade fagocítica de macrófagos abdominais	39
Figura 2	– Produção de NO por macrófagos abdominais	40
Figura 3	– Atividade antibacteriana de macrófagos abdominais	41
Figura 4	– Resistência sérica com 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos de incubação.....	44
Figura 5	– Resistência sérica em machos e fêmeas das linhagens de postura com 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos de incubação	45
Figura 6	– Resistência sérica em machos e fêmeas das linhagens de corte com 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos de incubação	46
Figura 7	- Peso relativo do baço.....	47
Figura 8	– Títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro em aves de linhagens de postura e linhagens de corte no dia 0	48
Figura 9	– Títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro em aves das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc no dia 0	49
Figura 10	– Títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro em fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CCc TT e LLc no dia 0.....	50
Figura 11	– Títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro em aves de linhagens de postura e linhagens de corte no dia 7	51
Figura 12	– Títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro em aves das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc no dia 7	52
Figura 13	– Títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro em fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CCc TT e LLc no dia 7.....	53
Figura 14	– Títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro em aves de linhagens de postura e linhagens de corte no dia 37	54
Figura 15	– Títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro em aves das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc no dia 37	55
Figura 16	– Títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro em fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CCc TT e LLc no dia 37.....	56
Figura 17	– Títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro em aves de linhagens de postura e linhagens de corte no dia 44	57

Figura 18 – Títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro em aves das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc no dia 44	58
Figura 19 – Títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro em fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CCc TT e LLc no dia 44	59
Figura 20 – Títulos de anticorpos naturais anti-hemácia de coelho no dia 0.....	60
Figura 21 – Títulos de anticorpos naturais anti-hemácia de coelho no dia 37.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Presença do halo de inibição em aves de linhagens de postura e de corte	42
Tabela 2 – Presença do halo de inibição em galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc.....	42
Tabela 3 – Presença do halo de inibição em frangos de corte das linhagens TT e LLc.....	42
Tabela 4 – Presença do halo de inibição fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc.....	43
Tabela 5 – Média seguida do erro padrão da média dos parâmetros hematológicos de aves de linhagens de postura e de corte.....	62
Tabela 6 – Média seguida do erro padrão da média dos parâmetros hematológicos de galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc	63
Tabela 7 – Média seguida do erro padrão da média dos parâmetros hematológicos de frangos de corte das linhagens TT e LLc	64
Tabela 8 – Média seguida do erro padrão da média dos parâmetros hematológicos de machos e fêmeas das linhagens MM, CC e CCc	65
Tabela 9 – Média seguida do erro padrão da média dos parâmetros hematológicos de machos e fêmeas das linhagens MM, CC e CCc	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACRBC	<i>Athens Canadian Random Bred Control</i>
AID	<i>Activation-Induced Cytidine Deaminase</i>
APC	Célula apresentadora de antígeno
BCR	Receptor de células B
Blimp 1	<i>B-lymphocyte-induced maturation protein 1</i>
ChB6	<i>Chicken B-cell marker</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HuSA	Albumina humana
i.a	Intra-abdominal
IAP -1	<i>Inhibitor of apoptosis protein-1</i>
IFN- γ	Interferon-gama
IL-2	Interleucina-2
IL -2 R γ	Cadeia-gama do receptor da interleucina 2
IL -15 R α	Cadeia-alfa do receptor para interleucina-15
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
KLH	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NHA	hidroxi-L-arginina
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NK	Células <i>natural killer</i>
NLR	Receptores semelhantes à NOD
NO	Óxido nítrico
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
Pax5	<i>Paired box gene 5</i>
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Proteína C reativa
PGE2	Prostaglandina E2
PRR	Receptor de reconhecimento padrão
SAP	Proteína amilóide sérica
TCR	Receptor de célula T
Th	Célula T <i>helper</i>

TLR	Receptor semelhantes à Toll
TNP-KLH	Trinitrophenyl conjugado com <i>Keyhole limpet hemocyanin</i>
UFC	Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	AVICULTURA X SELEÇÃO GENÉTICA	15
1.2	SISTEMA IMUNE DAS AVES.....	17
2	Objetivos	31
2.1	OBJETIVO GERAL.....	31
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	ANIMAIS	32
3.2	EXPERIMENTO I	32
3.2.1	Procedimento Experimental	32
3.2.1.1	Amostras bacterianas.....	33
3.2.1.2	Avaliação da atividade fagocítica	33
3.2.1.3	Atividade antibacteriana de macrófagos	33
3.2.1.4	Produção de óxido nítrico por macrófagos.....	34
3.2.1.5	Atividade antibacteriana do soro em ágar	34
3.2.1.6	Resistência sérica	35
3.3	EXPERIMENTO II	35
3.3.1	Procedimento Experimental	35
3.3.1.1	Solução de hemácia de carneiro	35
3.3.1.2	Solução de hemácia de coelho	36
3.3.1.3	Determinação dos títulos de anticorpos	36
3.3.1.4	Esfregaços sanguíneos.....	37
3.3.1.5	Hemograma	37
3.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38
4	RESULTADOS	39
4.1	EXPERIMENTO II	39
4.1.1	Atividade Fagocítica	39
4.1.2	Produção de Óxido Nítrico por Macrófagos	40
4.1.3	Atividade Antibacteriana de Macrófagos Abdominais	41

4.1.4	Atividade Antibacteriana do Soro em Ágar.....	42
4.1.5	Resistência Sérica.....	43
4.1.6	Peso Relativo do Baço.....	46
4.2	EXPERIMENTO II.....	48
4.2.1	Títulos de Anticorpos Anti-hemácia de Carneiro.....	48
4.2.2	Títulos de Anticorpos Naturais Anti-hemácia de Coelho.....	60
4.2.3	Parâmetros Hematológicos.....	62
5	DISCUSSÃO.....	67
6	CONCLUSÃO.....	76
	REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 AVICULTURA X SELEÇÃO GENÉTICA

A avicultura é uma das principais atividades da agroindústria nacional e mundial. O Brasil produziu 12.645 milhões de toneladas de carne de frango em 2012, e desse total 69% foram destinados ao mercado interno e 31% foram exportados. Além da produção de carne, a avicultura contribui para a economia nacional pela produção de ovos, em especial para atender o mercado interno. Em 2012 a produção de ovos no Brasil totalizou 31,7 bilhões de unidades e o consumo per capita foi de 161,53 unidades (UBA, 2013).

O ovo é um alimento nutritivo, de boa palatabilidade e de baixo custo. Um ovo contém altos níveis de proteínas e diversos nutrientes importantes como a riboflavina, selênio, vitaminas A, B, D, E e K, ácido fólico, ferro, colina, luteína e zeaxantina. Além disso, diversos estudos mostram que o ovo pode ser uma fonte barata de anticorpos que podem ser utilizados na imunoterapia e no imunodiagnóstico de doenças que atingem o homem ou os animais (HENRIQUE, 2002; CHACANA; TERZOLO, 2003).

O aumento da produção na indústria avícola tem sido favorecido pelo surgimento de técnicas modernas e da seleção genética (CHEEMA et al., 2003). O melhoramento genético de aves resultou em aves com propósitos específicos: frangos de corte e galinhas poedeiras. Estas linhagens se diferenciam no ganho de peso, longevidade, necessidades nutricionais e provavelmente na resposta imune (PARMENTIER et al., 2010).

Os mecanismos de defesa do organismo têm que competir por recursos metabólicos com outros processos fisiológicos, tais como crescimento e reprodução (CHUAMMITRI et al., 2011). A seleção genética para uma determinada característica, como maior ganho de peso, pode levar a uma alteração na distribuição de recursos energéticos para as diversas funções do organismo podendo afetar a sua imunocompetência e saúde (CHEEMA et al., 2003).

O controle de doenças infecciosas geralmente é feito pelo uso de vacinas, práticas de manejo e, quando necessário, o uso de antibióticos de amplo espectro (SWAGGERTY et al., 2009). Promotores de crescimento, como antibióticos em doses subterapêuticas, são aditivos alimentares utilizados para controlar agentes

patogênicos presentes no trato gastrointestinal, melhorando assim os índices zootécnicos e maximizando a produção (TOLEDO et al., 2007).

Apenas os antibióticos que não são absorvidos no trato digestivo foram autorizados como promotores de crescimento, portanto o risco de ocorrer reações devido à presença de resíduos de antibióticos nos alimentos é baixo. Contudo, a utilização de antibióticos como aditivos alimentares, a longo prazo, pode contribuir para o desenvolvimento de bactérias resistentes aos medicamentos utilizados para o tratamento de infecções. Esses micro-organismos resistentes representam um risco potencial caso sejam transferidos a seres humanos. Assim a União Européia tem proibido o uso de antibióticos como promotores de crescimento (CASTONON, 2007).

O aumento na produção de aves, juntamente com a restrição ao uso de antibióticos pode favorecer a disseminação de micro-organismos e o desenvolvimento de infecções. Apesar da disponibilidade de vacinas e outras medidas de controle para maioria das doenças aviárias, ainda podem surgir surtos de doenças. Uma vez que a avicultura pode ter grandes prejuízos econômicos devido a doenças infecciosas é importante o desenvolvimento de linhagens de aves mais resistentes a doenças (SWAGGERTY et al., 2009).

O melhoramento genético em relação à resposta imune pode ser uma maneira de melhorar os parâmetros de produção, a saúde e a resistência a infecções (SARKER et al., 2000).

No Brasil, a EMBRAPA Suínos e Aves possui um programa de melhoramento de aves e tem trabalhado no desenvolvimento de linhagens de galinhas poedeira e frangos de corte selecionadas para melhor produção. Entre as linhagens de galinhas poedeiras há a CC, a qual tem origem a partir da raça *White Leghorn*. É uma linhagem de postura de ovos brancos, e vem sendo selecionada para maior produção de ovos, peso dos ovos, melhor conversão alimentar, eclodibilidade, maturidade sexual, fertilidade, viabilidade e redução do peso corporal. A linhagem CC controle (CCc) tem a mesma origem da linhagem CC, porém não é selecionada para as características de interesse econômico. (FIGUEIREDO et al., 2003a). A MM é uma linhagem de postura de ovos castanhos originada da raça *Rhode Island Red*. Esta linhagem é selecionada para produção de ovos, peso dos ovos e redução do peso corporal.

Para frangos de corte, a linhagem TT é uma linha paterna selecionada para maior ganho de peso, conversão alimentar, rendimento de corte, viabilidade, fertilidade, eclodibilidade e para redução da gordura abdominal. A LLc é uma linhagem de corte, mantida como controle, ou seja, sem seleção genética. (FIGUEIREDO et al., 2003b). Estas linhagens foram desenvolvidas para alta produtividade, porém são poucos os estudos sobre o sistema imune destes animais.

1.2 SISTEMA IMUNE DAS AVES

As aves possuem mecanismos de defesa contra a invasão e o estabelecimento de agentes infecciosos, uma vez que a presença do agente infeccioso pode resultar em uma doença (CARDOSO, 2004). A identificação e a eliminação dos agentes infecciosos é uma das funções do sistema imune (KUGT; KLASING, 2009). O sistema imunológico das aves tem sido amplamente estudado em relação à resposta imune contra patógenos. Porém, são escassos os estudos sobre os mecanismos moleculares envolvidos com a resposta imune celular e, em especial, com a resposta imune humoral e a produção de anticorpos.

Em vertebrados, os mecanismos de imunidade podem ser divididos em dois tipos, a imunidade inata e a imunidade adaptativa (IWASAKI; MEDZHITOV, 2010).

A imunidade inata é a primeira linha de defesa (JAYASEKERA et al., 2007; MATSON et al., 2005). Ela é rapidamente ativada sem a necessidade de uma exposição prévia ao patógeno (CARVALHO et al., 1998) e promove uma resposta inicial podendo limitar ou impedir o processo infeccioso (KAISER, 2010). A resposta imune nos estágios iniciais da infecção é um fator crítico para a resistência ou a suscetibilidade a doenças (KUGT; KLASING, 2009).

Barreiras físicas, químicas e biológicas e células especializadas constituem o sistema imune inato (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000). A fagocitose, a liberação de mediadores inflamatórios, a ativação das proteínas do sistema complemento, a síntese de proteínas da fase aguda, citocinas e quimiocinas, são os principais mecanismos da imunidade inata (CRUVINEL et al., 2010).

A imunidade inata pode ainda ser dividida em humoral e celular. Proteínas e outras moléculas solúveis como lisozimas, proteínas do sistema complemento, defensinas, catelicidinas e pentraxinas são os componentes da

imunidade humoral (BEUTLER, 2004). Anticorpos naturais também fazem parte da imunidade inata humoral (MINOZZI et al., 2008).

As lisozimas são peptídeos antimicrobianos que catalisam a hidrólise de peptideoglicanos. São produzidas por neutrófilos, monócitos, macrófagos e células epiteliais. Estão em altas concentrações na saliva, nas vias aéreas, no leite e em outras secreções (VANDERKELEN et al., 2012).

Defensinas são pequenos peptídeos catiônicos, produzidas principalmente por leucócitos e células epiteliais. Em mamíferos há três classes, α -defensina, β -defensina e θ -defensina. Em aves existe apenas a família β -defensina (KAISER, 2010). São pouco compreendidos os mecanismos pelos quais as defensinas levam a morte do micro-organismo. Sabe-se que há o rompimento das membranas celulares (BEUTLER, 2004). Além disso, podem apresentar atividade quimiotática durante a resposta imune (KLOTMAN; CHANG, 2006).

As catelicidinas são produzidas por leucócitos, principalmente neutrófilos, e células epiteliais (OPPENHEIM et al., 2003). Essas proteínas destroem a membrana bacteriana e podem se ligar a lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas. Podem ainda ter atividade quimiotática (GENNARO; ZANETTI, 2000).

As pentraxinas são proteínas plasmáticas com estrutura pentamérica. Os principais membros são as pentraxinas curtas, proteína C-reativa (PCR) e proteína amiloide sérica (SAP). São produzidas no fígado em resposta a citocinas pró-inflamatórias. A PCR e a SAP desempenham importante papel na remoção de fosfolipídios de membrana e componentes celulares de células mortas. Também são capazes de ativar o sistema complemento pela via clássica (DU CLOS; MOLD, 2011).

O sistema complemento compreende um conjunto de proteínas proteolíticas, que quando ativadas tem como função defender o hospedeiro contra infecções. A ativação do sistema complemento pode ocorrer por três vias. A via clássica é ativada por anticorpos ligados a antígenos e depende também das proteínas C1, C2, C3 e C4. A via alternativa é ativada na superfície do micro-organismo, com a participação de C3, da properdina, fator B, D, H e I. A ativação pela via das lectinas ocorre pela ligação de lectinas plasmáticas a resíduos de manose presentes na superfície do micro-organismo. Essas vias levam a ativação

das proteínas C5, C6, C7, C8 e C9, resultando na formação do complexo de ataque a membrana sobre a célula-alvo (BEUTLER, 2004; TEGLA et al., 2011).

A ativação do sistema complemento por qualquer uma das três vias pode levar a diversos efeitos biológicos como opsonização e fagocitose do micro-organismo, atividade anti-inflamatória e quimiotática, ativação de granulócitos e células endoteliais, ativação de células B e por fim a formação do complexo de ataque à membrana, que pode lisar bactérias gram-negativas e vírus (BEUTLER, 2004; WILLS-KARP, 2007).

Os anticorpos naturais estão presentes em indivíduos não imunizados (BAUMGARTH et al., 2005). Esses anticorpos são polirreativos e são caracterizados pela baixa afinidade de ligação (LAMMERS et al., 2004). O repertório desses anticorpos é polirreativo para estruturas filogeneticamente conservadas como ácidos nucleicos, carboidratos, fosfolipídios e proteínas de choque térmico (BOES, 2000). Epítomos altamente conservados presentes em micro-organismos são reconhecidos pelos anticorpos naturais (BERCZI et al., 1998). Aves não imunes apresentam anticorpos naturais contra vários antígenos (PARMENTIER et al., 2008). Os níveis desses anticorpos aumentam de acordo com a idade dos animais, indicando uma sensibilização ambiental (PARMENTIER et al., 2004; STAR et al., 2007).

Células *Natural Killer* (NK), macrófagos, neutrófilos, mastócitos, basófilos e eosinófilos compõem a imunidade inata celular (CRUVINEL et al., 2010). Os macrófagos são células capazes de reconhecer, fagocitar e destruir micro-organismos. Essas células produzem citocinas e quimiocinas (QURESHI, 2003) e regulam a resposta imune adaptativa, a inflamação, o reparo e o remodelamento tecidual (KLASING, 1998). Em aves, as células equivalentes a neutrófilos encontrados em mamíferos são os heterófilos. Essas células fagocitam micro-organismos invasores e são as primeiras células a estarem no local da infecção. Após a fagocitose, o patógeno ingerido é internalizado no fagossomo e destruído por diversos mecanismos, como a produção de radicais livres. Os heterófilos também podem liberar proteínas presentes em grânulos dentro do fagossomo para matar o micro-organismo fagocitado (KAISER, 2010).

A produção de óxido nítrico (NO) é o principal mecanismo pelo qual macrófagos destroem micro-organismos após a fagocitose. O NO é um gás solúvel em água e lipídeos e é considerado uma espécie reativa de nitrogênio. A óxido

nítrico sintase induzível (iNOS) é a enzima responsável pela produção de NO em macrófagos, e sua expressão ocorre após o estímulo por citocinas e produtos microbianos (MACMICKING et al., 1997). Para a síntese de NO, primeiramente ocorre a hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinos da L-arginina para gerar hidroxi-L-arginina (NHA). Esta reação depende de NADPH e oxigênio. Em seguida ocorre a conversão da NHA em NO e citrulina (MARLETTA, 1993). O NO reage com outros radicais livres e metais de transição. Sua toxicidade é provavelmente devido a sua reação com superóxido resultando na produção de peroxinitrito, um agente altamente oxidante (BECKMAN; KOPPENOL, 1996).

As células NK são capazes de distinguir células infectadas ou tumorais e destruí-las através da liberação dos conteúdos presentes nos grânulos líticos sobre as células-alvo (LONG et al., 2013).

Os eosinófilos são células que possuem grânulos que armazenam proteínas catiônicas, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que estão disponíveis para liberação imediata. São importantes nas infecções por helmintos e podem causar danos aos tecidos do hospedeiro em reações alérgicas. Também atuam na inflamação e remodelamento tecidual. Podem ser encontrados em pequeno número na circulação. A maioria reside em tecidos de mucosa e são recrutados rapidamente a locais de infecções por helmintos ou em resposta a alérgenos (SHAMRI et al., 2011).

Basófilos e mastócitos possuem grânulos citoplasmáticos contendo várias moléculas efetoras tais como substâncias vasodilatadoras (histamina), citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos. Essas células contribuem com a defesa do hospedeiro contra helmintos e também estão envolvidas com reações alérgicas (VOEHRINGER, 2013).

Moléculas conservadas presentes em micro-organismos, denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), são detectadas pelas células e moléculas da imunidade inata. Exemplos destas moléculas são o LPS, o ácido lipotecóico, a flagelina, o peptidoglicano e o ácido nucleico microbiano (KAISER, 2010). Os PAMPs são reconhecidos por receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como os receptores semelhantes à Toll (TLRs), receptores semelhantes à NOD (NLRs), os receptores *scavenger*, entre outros, que apresentam baixa especificidade (GETZ, 2005). O reconhecimento de PAMPs pelos PRRs ativa os mecanismos efetores da imunidade inata, induzindo várias cascatas

de ativação extracelular e vias de sinalização intracelular que levam a resposta inflamatória e recrutamento de células com a finalidade de eliminar o patógeno (KUGT; KLASING, 2009).

Os TLRs são os PRRs mais estudados. TLRs que reconhecem componentes da superfície celular do patógeno são expressos na superfície da célula do hospedeiro, e aqueles que reconhecem ácidos nucleicos são expressos em vesículas endocíticas. O reconhecimento de PAMPs pelos TLRs pode levar a indução de diversas vias de sinalização, como a via fator nuclear kappa B (NF- κ B) e a via proteína quinase ativada por mitógeno, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e a expressão de moléculas co-estimulatórias. Esse processo leva ao recrutamento e ativação de outras células, tanto da imunidade inata como adaptativa (KAISER, 2010).

Em mamíferos tem sido descritos 13 TLRs diferentes. Em aves são encontrados 10 TLRs. Os TLRs 3, 4, 5 e 7 são semelhantes aos encontrados em mamíferos. Os TLR1LA, 1LB e 15, são encontrados exclusivamente em aves. Os genes duplicados TLR2A e TLR2B presentes nas aves, são semelhantes ao único gene TLR2 encontrado em mamíferos. O TLR2A e o TLR2B reconhecem peptídeos e lipopetídeos encontrados em bactérias gram-positivas. O TLR3 e o TLR7 se ligam a ácido nucleico de vírus. LPS de bactérias gram-negativas se liga ao TLR4. Flagelina bacteriana é reconhecida por TLR5. Os ligantes e os patógenos reconhecidos pelos TLR1LA, TLR1LB, TLR15 e TLR21 ainda são desconhecidos (TEMPERLEY et al., 2008).

Os NLRs são receptores citoplasmáticos que regulam a resposta inflamatória. Após reconhecerem seus ligantes, esses receptores ativam caspases inflamatórias, como a caspases-1, levando à ativação de citocinas pró-inflamatórias ou à via de sinalização NF- κ B. Existem duas subfamílias de NLRs, os NODs e os NAPLs. O NOD2 reconhece peptídeo de bactérias gram-negativas e gram-positivas, enquanto o NOD1 reconhece apenas peptídeo de bactérias gram-negativas. Os NAPLs também reconhecem peptídeos bacterianos, porém pouco se sabe sobre seus ligantes. Apenas NOD 1 é encontrado em aves, NOD2 e NAPLs são aparentemente ausentes (KAISER, 2010).

As RNA helicases fazem parte de outro grupo de receptores que reconhecem RNA viral. Em mamíferos pode ser encontrado o RIG-1, que reconhece

RNA com trifosfato 5', e o MDA 5 que pode reconhecer RNA dupla fita. Em aves é encontrado apenas o MDA 5 (KAISER, 2010).

Os receptores que reconhecem carboidratos na superfície de patógenos podem facilitar a fagocitose e a destruição destes micro-organismos. Entre esses receptores há o receptor de manose presente em células apresentadoras de antígeno (APC), como as células dendríticas e macrófagos. A ligação do receptor de manose leva a ingestão do micro-organismo (KAISER, 2010).

Os mecanismos da imunidade inata levam a uma resposta inicial contra o patógeno, eliminando ou limitando a infecção, e também é capaz de induzir uma resposta específica adequada (KAISER, 2010). Embora muito eficaz, a imunidade inata, muitas vezes, não é capaz de eliminar o patógeno. Neste caso a imunidade adaptativa é fundamental para prevenir a infecção (ERF, 2004).

A imunidade adaptativa pode demorar semanas para gerar uma resposta efetiva contra o patógeno (BORGHESI; MILCAREK, 2007). Possui alta especificidade, memória imunológica e ampla diversidade, sendo capaz de reconhecer várias estruturas presentes em um único antígeno (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000). Os principais componentes da resposta imune adaptativa são os linfócitos T e B e seus produtos (BARTL et al., 2003).

A especificidade ao patógeno é determinada pelos receptores de células T (TCR), presentes na superfície celular dos linfócitos T, e pelos receptores de célula B (BCR) localizados na superfície de linfócitos B. Apenas após a ligação de estruturas do patógeno aos receptores, em combinação a vários sinais co-estimulatórios, inicia-se a resposta imune primária contra o patógeno. O agente patogênico geralmente é eliminado e a resposta imune cessa. Além disso, linfócitos T e linfócitos B de memória são produzidos durante a resposta primária. Em um novo contato com o agente agressor as células de memória são capazes de responder de uma forma mais rápida e eficaz, essa é resposta imune secundária (JEURISSEN et al., 2000).

Os mecanismos de imunidade adaptativa podem ser divididos em imunidade celular, mediada por linfócitos T, e em imunidade humoral, mediada por anticorpos produzidos por linfócitos B (JEURISSEN et al., 2000).

Os linfócitos T são capazes de reconhecer apenas antígenos processados em fragmentos peptídicos ligados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Além do TCR, os linfócitos T expressam moléculas

de superfície que são indicativos de sua função como as moléculas CD4 e CD8. A molécula CD4 está presente nas células T *helper* (Th) e tem a função de auxiliar ou regular a resposta imune humoral e celular. A molécula CD8 está associada à função citotóxica levando a destruição de células-alvo que expressam antígenos associados a moléculas de MHC I (JEURISSEN et al., 2000).

A resposta imune humoral pode ser definida como a capacidade do animal em produzir anticorpos específicos em resposta à estimulação antigênica. Ela é dependente da presença de linfócitos B e do desenvolvimento de uma série de mecanismos moleculares pouco compreendidos em aves.

Os linfócitos B são células especializadas na produção de anticorpos, tem sua origem a partir de células da medula óssea e, em aves, sofrem o processo de maturação em um órgão chamado de Bursa de Fabricius.

A Bursa de Fabricius é um órgão encontrado somente em aves, com formato de um saco oco, localizado dorsalmente à cloaca com a qual se comunica através de um ducto (CIRIACO et al., 2003). É revestida internamente por dobras de tecido epitelial, que se projetam em direção à luz do órgão. Estas dobras são sustentadas por tecido conjuntivo, com ocorrência de inúmeros folículos linfoides. Estes folículos linfoides apresentam uma região cortical rica em linfócitos, linfoblastos, plasmócitos e macrófagos e uma região medular onde são encontrados principalmente linfócitos, linfoblastos, reticulócitos e plasmócitos (GLICK, 1986; TIZARD, 1998).

Atualmente os mecanismos de geração de diversidade são relativamente bem conhecidos, porém, pouco se conhece sobre as diferentes etapas do desenvolvimento de linfócito B na bursa. Acredita-se que o desenvolvimento de linfócitos B inicia-se com o rearranjo dos genes das imunoglobulinas nos sítios hematopoiéticos do embrião, seguido de uma etapa de expansão clonal na bursa de Fabricius e a posterior saída das células B para a periferia (SAYEGH et al., 1999). Estudos mostram que a bursa de Fabricius é colonizada por células precursoras de linfócitos B IgM⁺ que são oriundas de diferentes sítios hematopoiéticos do embrião. A expressão de IgM na superfície das células B em desenvolvimento é crítica para a sobrevivência das células B. A IgM na superfície das células B em desenvolvimento encontra-se em associação com as proteínas Igalfa/Igbeta formando o BCR. As proteínas Igalfa e Igbeta têm um papel fundamental para o desenvolvimento das células B em galinhas (PIKE et al., 2004a; PIKE et al., 2004b). Ao contrário dos

mamíferos, as células B em desenvolvimento de aves não expressam um pré-receptor de células B (pré-BCR) em associação com as proteínas VpreB e lambda5. Recentemente, a presença de um gene VpreB foi detectada em células de galinha e parece participar na maturação e secreção da cadeia leve das imunoglobulinas (ROSNET et al., 2004). Acredita-se que o rearranjo dos genes das imunoglobulinas gere uma diversidade muito limitada e o BCR encontrado em células B em desenvolvimento de aves tenha uma função análoga ao pré-BCR de células B de mamíferos.

A organização dos loci que codificam para as cadeias leves e pesadas das imunoglobulinas de aves é bem diferente da observada em mamíferos. Em galinhas, o locus da cadeia leve é composto de apenas um segmento V, um segmento J e um segmento CL. Enquanto o locus da cadeia pesada tem um segmento V, vários segmentos D e apenas um segmento J. Em aves, a geração de diversidade é dependente de dois mecanismos, a conversão gênica e a hipermutação. Na conversão gênica há a combinação de um segmento V com uma coleção de segmentos de pseudo-genes, e é caracterizada pelo grande número de mutações no gene V formado. A conversão gênica e a hipermutação somática são processos dependentes da enzima *Activation-Induced cytidine Deaminase* (AID) (MAGARI et al., 2010). É interessante observar que o rearranjo nos genes das imunoglobulinas de aves inicia-se no quinto dia de desenvolvimento embrionário e termina antes do nascimento, ao contrário do observado em mamíferos. Por outro lado, a geração de diversidade das imunoglobulinas é continuada pelo processo de conversão gênica que tem início após o décimo quinto dia de desenvolvimento embrionário na bursa de Fabricius (KOHONEN et al., 2007).

Próximo ao nascimento, as células B começam a sair da bursa de Fabricius e colonizam os órgãos e tecidos linfoides secundários até a ave atingir a maturidade sexual, quando então a bursa começa a involuir. É estimado que apenas 5% das células B saiam da bursa, enquanto o restante morre no próprio órgão onde desempenham suas funções imunológicas (HEMMINGSSON; LINNA, 1972).

As populações de linfócitos B geralmente ocorrem de forma organizada nos folículos linfoides. Os folículos são compostos por uma massa uniforme de pequenas células densamente agrupadas, geralmente linfócitos B virgens e linfócitos B de memória. Diante da estimulação antigênica, esse folículo cresce em tamanho e se transforma em folículo secundário, com um centro claro,

redondo ou oval, denominado centro germinativo, rodeado pelo tecido linfoide que forma uma condensação especial ao redor de um dos polos do centro germinativo, denominada calota ou coroa externa (BANKS, 1992; GENESER, 2003). O centro germinativo apresenta linfócitos B ativados e em processo de proliferação ativa, células dendríticas que formam o retículo celular, linfócitos Th, e macrófagos. Nas regiões adjacentes aos folículos são encontrados principalmente linfócitos T (BANKS, 1992; GENESER, 2003). Os centros germinativos são estruturas histológicas que correspondem a regiões de intensa proliferação celular resultado do reconhecimento do antígeno e da ativação das células B. Além das células B são encontrados linfócitos T, macrófagos e células dendríticas. As células dendríticas foliculares têm um importante papel no desenvolvimento do centro germinativo e da resposta imune humoral. Recentemente, as células dendríticas foliculares (CDF) foram isoladas da tonsila cecal de galinhas e caracterizadas (DEL CACHO et al., 2008). Na superfície das CDF foi detectada a presença de anticorpos IgM e IgG, dos componentes C3 e B do sistema complemento e das moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1. As CDF de galinhas têm a capacidade de capturar antígeno ou imunocomplexos e de estimular a síntese de anticorpos, como as CDF de mamíferos (DEL CACHO et al., 2008).

Os folículos linfoides são abundantemente encontrados nos órgãos linfoides secundários. Nas aves, o baço é o principal órgão linfoide secundário. Ele localiza-se adjacente à superfície dorsal do lóbulo direito do fígado e dorsalmente ao pró-ventrículo. Apresenta coloração de aspecto marrom avermelhado (JEURISSEN; JANSE, 1989). O baço é responsável pela resposta contra antígenos presentes na circulação sanguínea. Este órgão também é responsável pela seleção e destruição de hemácias envelhecidas (ROITT, 1999). Em aves, o baço apresenta-se envolto por uma cápsula de tecido conjuntivo que penetra no parênquima do órgão, formando pequenas trabéculas. Estas trabéculas permeiam regiões denominadas de polpa branca e polpa vermelha (GLICK, 1986). A polpa branca é constituída pelas ramificações da artéria trabecular, denominadas arteríolas centrais que são envolvidas por uma bainha de tecido linfoide rica em linfócitos T, denominada bainha periarteriolar. Entre as bainhas, ocorrem acúmulos de linfócitos B em formações nodulares os chamados centros germinativos (JEURISSEN; JANSE, 1989). A polpa vermelha é constituída por sinusóides e cordões celulares que apresentam macrófagos, granulócitos, plasmócitos e células reticulares (JEURISSEN et al., 1992).

A glândula de Harder é encontrada numa região posterior e medial ao globo ocular das aves. Suas funções são a lubrificação da superfície do globo ocular e a produção de imunoglobulinas (WIGHT et al., 1971). Nas galinhas, a glândula de Harder apresenta estrutura lobular e glândulas cuja porção secretora apresenta morfologia túbulo acinar. Entre as unidades secretoras, ocorrem células intersticiais e relevante presença de linfócitos. A maioria dos linfócitos presentes nesta glândula é do tipo B produtores de IgA, detectada na lágrima (BABA et al., 1988).

As tonsilas cecais são estruturas bilaterais localizadas na junção do intestino delgado com o intestino grosso (GLICK, 1986). Apresentam características histológicas semelhantes às encontradas ao longo do intestino, como regiões mucosas, submucosas, criptas glandulares e células epiteliais, camada de tecido muscular do órgão e presença marcante de tecido linfoide associado à mucosa (MORGULIS, 2002). As tonsilas cecais contêm em sua luz vários micro-organismos residentes da microbiota bacteriana normal do intestino. O tecido linfoide associado à mucosa nesta região apresenta linfócitos B, linfócitos T, APCs, células M e grande produção de imunoglobulinas, responsáveis pela regulação da alta atividade bacteriana local e defesa contra infecções do trato gastrointestinal (GLICK, 1986; BANKS, 1992).

As placas de Peyer são acúmulos de tecidos linfoides associados à mucosa intestinal das aves, semelhantes aos encontrados no intestino de mamíferos. São localizadas na região do íleo e na junção ileocecal do intestino das aves (BEFUS et al., 1980; BURNS, 1985). Sua função imunológica está relacionada ao controle da microbiota intestinal e à defesa contra a entrada de microrganismos patogênicos ou oportunistas através da mucosa. No tecido linfoide podem ser encontrados plasmócitos produtores de imunoglobulinas da classe IgA, linfócitos T e células apresentadoras de antígeno (BURNS, 1985).

A imunidade humoral envolve a interação dos linfócitos B com um antígeno e a subsequente proliferação e diferenciação em células secretoras de imunoglobulinas, os plasmócitos (SCOTT, 2004). Todos estes processos, em mamíferos, envolvem a modulação da expressão de múltiplos genes. Em aves, são poucos estudos que investigaram a modulação da expressão de genes envolvidos na ativação e diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, e na produção de anticorpos.

Em galinhas, a diferenciação de células B virgens em células produtoras de anticorpos envolve o aumento da expressão do fator de transcrição chamado *B-lymphocyte-induced maturation protein 1* (Blimp1) e a diminuição da expressão do fator de transcrição *paired box gene 5* (Pax5) (MAGARI et al., 2009).

Um estudo sobre a associação entre a presença de polimorfismo nas regiões promotoras dos genes para o interferon-gama (IFN- γ), interleucina-2 (IL-2) e para a cadeia leve das imunoglobulinas mostrou que o gene para o IFN- γ tem um papel importante na produção de anticorpos e que provavelmente há uma interação entre os genes estudados para a produção de anticorpos (ZHOU et al., 2001).

Em estudo semelhante sobre o efeito do polimorfismo dos genes *chicken B-cell marker* (ChB6), *caspase-1*, *inhibitor of apoptosis protein-1* (IAP-1), cadeia-alfa do receptor para interleucina-15 (IL-15R α), cadeia-gama do receptor da interleucina 2 (IL-2R γ), e o *immunoglobulin supfamily gene* (ZOV3), foi observado uma associação entre o polimorfismo genético e os níveis de anticorpos produzidos para todos os genes estudados com exceção do gene IL-2R γ (ZHOU; LAMONT, 2003).

A resposta imune humoral é influenciada por diversos fatores. A presença de anticorpos maternos nas semanas iniciais de vida do animal é um dos fatores com grande influência no desencadeamento da resposta imune humoral contra um antígeno específico. Os anticorpos maternos são muito importantes na proteção do animal nos seus primeiros dias de vida. Porém, estudos têm mostrado que a presença de anticorpos maternos específicos pode influenciar negativamente a resposta imune humoral do animal (ELAZAB et al., 2009).

Moléculas produzidas no início da resposta imune podem ter um papel importante na modulação da resposta imune humoral. A prostaglandina E2 (PGE2) é um potente imunomodulador derivado do ácido aracônico e que participa na regulação da imunidade humoral em mamíferos. Em galinhas poedeiras, o tratamento com PGE2 na resposta imune primária resulta numa redução dos níveis de anticorpos específicos enquanto a sua administração na resposta imune secundária leva a um aumento na produção de anticorpos (SIJBEN et al., 2000b). É interessante observar que um mesmo fator pode afetar de modo diferente a produção de anticorpos contra diferentes antígenos.

Outro fator importante é o estado nutricional do animal. Além de um

importante papel no aumento do desempenho reprodutivo ou na produção de aves, a nutrição também é necessária para melhorar a resistência a doenças infecciosas. Os títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro em frangos submetidos à dieta com alto teor de proteínas foram significativamente mais altos que em frangos submetidos à dieta com quantidades mínimas de proteína, indicando que a administração de proteínas em níveis maiores pode melhorar a resposta imune e a resistência a doenças (DEIF et al., 2007).

Uma dieta rica em ácido linoleico aumenta a produção de anticorpos contra o antígeno *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH)-DNP, reconhecido como estimulador das células Th2, por outro lado, reduz a produção de anticorpos contra *Mycobacterium butyricum*, antígeno estimulador das células Th1 (SJIBEN et al., 2000a; 2001).

Fatores ambientais, como o frio, também influenciam a resposta imune humoral. Estudos em galinhas têm mostrado que o estresse pelo frio pode resultar num aumento dos níveis de anticorpos naturais (HANGALAPURA et al., 2003).

A ativação e diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos resultam na produção das imunoglobulinas, que são as moléculas efetoras da imunidade humoral. As imunoglobulinas são glicoproteínas cuja função é se ligar especificamente ao antígeno, provocando a sua neutralização, aglutinação, precipitação, opsonização e ativação do sistema complemento (TIZARD, 1998). Nas aves, três classes de imunoglobulinas são produzidas: IgM, IgA e IgY. (GLICK, 1986; MORGULIS, 2002).

A IgM e IgA das aves são equivalentes às imunoglobulinas presentes nos mamíferos, quanto à estrutura, peso molecular e mobilidade eletroforética (CARLANDER, 2002). A classe de anticorpos IgM aparece depois de aproximadamente 5 dias de exposição ao antígeno e seus títulos diminuem entre o 10º e o 12º dia. A IgA é produzida geralmente após o 5º dia de exposição ao agente infeccioso em locais específicos, como nas secreções dos intestinos, do trato respiratório e secreções lacrimais (BURNS, 1985).

A principal imunoglobulina encontrada nas aves é a IgY, cujas características estruturais assemelham-se à IgG dos mamíferos. A IgY tem massa molecular de aproximadamente 160 kDa, apresenta ponto isoelétrico variando entre 5,7 e 7,6 e é constituída por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas. Cada

cadeia leve apresenta massa molecular de aproximadamente 18 kDa e é formada por uma região variável e uma região constante. A cadeia pesada tem uma massa molecular de 65 kDa e é formada por uma região variável e quatro regiões constantes. Como ocorre na IgG dos mamíferos, a região Fc da IgY aviária é responsável por suas funções biológicas efetoras como a fixação do complemento e opsonização (CARLANDER, 2002).

Além de estar presente no sangue das aves, a IgY pode ser encontrada na gema dos ovos em altas concentrações, enquanto que a IgM e a IgA são principalmente encontradas na clara. Receptores para IgY presentes nos folículos ovarianos captam estas moléculas da circulação sanguínea materna e transferem para a gema. A quantidade de IgY transferida independe do tamanho do ovo e está relacionada com sua concentração no soro plasmático das galinhas (MOHAMMED et al., 1998; MORRISON et al., 2001).

Uma vez que os anticorpos podem ser extraídos da gema do ovo de galinha, o uso de IgY representa uma alternativa interessante ao uso de anticorpos de mamíferos, geralmente IgG, obtidos a partir de animais de laboratório imunizados. Comparada à IgG dos mamíferos, a IgY das aves apresenta várias vantagens operacionais, como o menor custo de produção, a possibilidade de ser produzida em grandes quantidades e o fato de não ser necessário eutanaziar a ave para obtê-la. Além dos aspectos referentes ao bem-estar animal, a quantidade de anticorpo produzida nos ovos de galinha é maior que a quantidade de anticorpos produzidos em coelhos e outros mamíferos (CHACANA; TERZOLO, 2003).

As diferenças na porção Fc dos anticorpos de aves e mamíferos, fazem que os anticorpos de galinha não ativem o sistema complemento dos mamíferos, nem apresentem reações cruzadas com os fatores reumatóides. Assim, minimizam-se as falsas reações positivas quando são avaliados marcadores de inflamação (proteína C reativa), uma característica importante para o estudo dos processos inflamatórios. Além disso, a IgY apresenta menor fluorescência inespecífica em preparações imunofluorescentes e também pode ser usada na maioria dos testes de aglutinação (CHACANA et al., 2004).

A possibilidade de produção de grandes quantidades de IgY específicas com custos menores quando comparado à produção de IgG de mamíferos, permite o uso de anticorpos com fins profiláticos e terapêuticos, como, por exemplo, na prevenção ou no tratamento da diarreia de bezerras e suínos

recém-nascidos (CHACANA et al., 2004).

Considerando a importância da avicultura, é necessário um melhor entendimento sobre o sistema imunológico das aves. Devido à existência de poucos estudos sobre os mecanismos moleculares envolvidos na resposta imune destes animais, este trabalho buscou identificar diferenças na resposta imune entre as linhagens de galinhas estudadas. Desta forma será possível a realização de estudos que permitam a identificação de características genéticas que possam ser utilizadas para o desenvolvimento de novas linhagens de galinhas poedeiras e de frangos de corte mais resistentes a patógenos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a resposta imune em diferentes linhagens de galinhas poedeiras e frangos de corte desenvolvidas pela EMBRAPA Suínos e Aves.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar atividade fagocítica, a produção de óxido nítrico e a atividade antimicrobiana de macrófagos abdominais de galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc e de frangos de corte das linhagens TT e LLc;
- Analisar a atividade antimicrobiana do soro de galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc e em frangos de corte das linhagens TT e LLc;
- Avaliar a resistência sérica de galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc e em frangos de corte das linhagens TT e LLc;
- Obter o peso relativo do baço de galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc e em frangos de corte das linhagens TT e LLc;
- Determinar os títulos de anticorpos específicos e anticorpos naturais em galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc e em frangos de corte das linhagens TT e LLc, imunoestimuladas com hemácia de carneiro;
- Caracterizar o perfil hematológico de galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc e de frangos de corte das linhagens TT e LLc.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 140 animais, 70 machos e 70 fêmeas, sendo 28 animais da linhagem MM, 28 animais da linhagem CC, 28 animais da linhagem CC controle (CCc), 28 animais da linhagem TT e 28 da linhagem LL controle (LLc). Os animais foram fornecidos pela EMBRAPA Suínos e Aves (Concórdia/Santa Catarina) e mantidos em gaiolas (2 animais/gaiola) nas instalações da Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina, com água e ração à vontade.

A utilização dos animais foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina.

3.2 EXPERIMENTO I

3.2.1 Procedimento Experimental

Para avaliação da atividade fagocítica, produção de NO e atividade antibacteriana de macrófagos abdominais foram utilizados 10 animais de cada linhagem, 5 machos e 5 fêmeas, com 18 semanas de idade. Os animais receberam uma injeção intra-abdominal (i.a.) de uma solução estéril de Sephadex G-50 Fine a 3% em solução salina a 0,9% (1 mL de solução de Sephadex para cada 100g de peso corporal), a fim de promover a ativação abdominal dos macrófagos. Após dois dias, os animais foram pesados e abatidos. Após o abate foram injetados 20 mL de meio RPMI-1640, estéril, na cavidade abdominal. A pele das aves na região abdominal foi rebatida e foi feita uma massagem no abdômen para soltar os macrófagos aderidos às alças intestinais. O lavado abdominal foi coletado e mantido em banho de gelo, em tubos falcon (15 mL) até ser processado para as análises fagocíticas, produção de NO e atividade antibacteriana. As células obtidas do lavado abdominal foram quantificadas na câmara de Neubauer e ajustadas para a concentração de $1,0 \times 10^6$ células/mL. O baço dos animais abatidos foi coletado e pesado para obtenção do peso relativo. Também foram coletadas amostras de sangue sem anticoagulante. Após a coagulação a 37°C por 15 minutos o sangue foi

refrigerado a 4°C por uma hora para a obtenção de soro, em seguida foi centrifugado a 559 g por 5 minutos a 4°C. O soro foi mantido a -20°C até o momento do uso para avaliação antibacteriana e resistência sérica.

3.2.1.1 Amostras bacterianas

Foram utilizadas amostras bacterianas (*Escherichia coli* K12 cepa 711, *E. coli* K12 cepa HB101, *Salmonella enterica* Enteritidis ATCC 13076) pertencentes à coleção do Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada, do Departamento de Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina. As amostras foram estocadas à -80°C, em meio Brain Heart Infusion (BHI - Difco®) contendo 20% de glicerol (Merck®), até o momento de uso.

3.2.1.2 Avaliação da atividade fagocítica

O lavado obtido foi colocado sobre lamínulas em placas de 6 poços (1,0 x 10⁶ células+RPMI/mL) e incubadas por 1 hora em estufa de CO₂. Após a incubação, as lamínulas foram lavadas com RPMI para remover as células não aderentes. Em seguida foram co-incubadas por 30 minutos na estufa de CO₂ com 1x10⁷ de *Salmonella enteritidis*. Após esse período o sobrenadante presente na placa colocado em tubos plásticos de 1,5 ml e armazenado a -20°C até o momento do uso para avaliação da produção de NO. As lamínulas foram lavadas com RPMI. Foi colocado metanol sobre as lamínulas e retirado após 20 minutos, em seguida foi colocado corante e deixado por 20 minutos. Após a retirada do corante, as lamínulas foram lavadas com Sorensen e colocadas para secar. As lâminas foram montadas e observadas em microscópio óptico no aumento de 1000 X. Um total de 20 campos foram contados e calculado a porcentagem de macrófagos que fagocitaram bactérias.

3.2.1.3 Atividade antibacteriana de macrófagos

Foram colocadas em placas de 24 poços 1,0 x 10⁶ células+RPMI/mL, obtidas do lavado abdominal. Em seguida foi colocado 1,0 x 10⁷ de *Salmonella enteritidis* / mL. As placas foram incubadas na estufa de CO₂. Após 1 hora, as células foram

lisadas colocando 200 µL de água destilada estéril. Alíquotas de 1 ml de meio RPMI contendo bactérias sobreviventes aos macrófagos foram diluídas e semeadas em meio seletivo ágar Mac Conkey (Oxoid®) para posterior contagem de colônias. As placas foram incubadas a 37°C durante 18-24 horas. Colônias bacterianas foram contadas e calculadas em unidades formadoras de colônias sobreviventes/mL. Os testes foram realizados em triplicata.

3.2.1.4 Produção de óxido nítrico por macrófagos

A capacidade de produção de NO pelos macrófagos abdominais foi avaliada através do método de Griess. A concentração de NO (µM/mg) foi calculada utilizando padrões de nitrito de sódio nas concentrações de 125 µM, 62,5 µM, 31,25 µM, 15,6 µM, 7,8 µM e 3,9 µM de nitrito. Água destilada foi usada como branco. As amostras foram obtidas a partir do sobrenadante formado durante o procedimento para avaliação da atividade fagocítica (item 3.2.1.2). Foi colocado 100 µL/poço da amostra, em microplacas de 96 poços de fundo chato (8 linhas x 12 colunas). Cada amostra foi testada em duplicata. Em seguida foi preparada a solução de Griess (v/v de cloridrato naftileteonediamina 0,1% e sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5%) e acrescentada 100µL/poço. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 550 nm.

3.2.1.5 Atividade antibacteriana do soro em ágar

Para o teste, 10^8 bactérias/mL (*E. coli* K12 cepa 711 e *E. coli* K12 cepa HB101) foram estimadas utilizando a escala de McFarland 0,5. Esta suspensão bacteriana foi semeada em toda superfície da placa contendo meio ágar Muller Hinton (MH - Difco®) através de um “swab” esterilizado. Um volume de 10 µL do soro de aves foi adicionado sobre a superfície do meio semeado. O material foi incubado a 37°C durante 18-24 h. O diâmetro dos halos de inibição foi medido (mm). A interpretação do resultado foi pela observação da presença ou ausência de halos de inibição nas diferentes amostras.

3.2.1.6 Resistência sérica

E. coli K-12 cepa 711 foi cultivada em meio LB por 24 h a 37 °C sob agitação, diluídas 1:100 e repicadas até atingir a fase log. Posteriormente as amostras de soro foram centrifugadas a 139,75 g por 2 minutos e ressuspendidas em tampão fosfato-salina 1X (PBS), pH 7,4.

Foram adicionadas em microplacas de 96 poços com fundo chato, 87,5µL de suspensão bacteriana e 50µL de soro das aves e incubados a 37°C. Cada soro foi testado em triplicata. Foi determinada a densidade ótica, por meio de uma leitora de microplacas a 630nm, nos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos de incubação (PELKONEN; FINNE, 1987).

3.3 EXPERIMENTO II

3.3.1 Procedimento Experimental

Para determinação de anticorpos específicos e anticorpos naturais foram utilizados 18 animais de cada linhagem, 9 machos e 9 fêmeas, com 22 semanas de idade. Os animais foram inoculados com hemácias de carneiro a 5% em PBS 1X (pH 7,4) por via intramuscular (200 µl/animal). Uma segunda inoculação foi realizada após 30 dias. Sangue periférico foi coletado a partir da veia braquial nos dias 0 (pré-imune), 7, 37 e 44. As amostras de sangue foram colocadas em tubos de vidro contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), e utilizadas para análises hematológicas ou processadas para obtenção de plasma e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

3.3.1.1 Solução de hemácia de carneiro

Foi coletado um volume de sangue de carneiro em um mesmo volume de Alsever's (glicose 20,5g; citrato de sódio 8 g; cloreto de sódio 4,2 g, água destilada q.s.p. 1000 ml e ácido cítrico para ajuste do pH em 6,1). A seguir o sangue foi centrifugado a 559 g por 5 minutos a temperatura ambiente, e o sobrenadante e a camada de leucócitos foram descartados. As hemácias foram lavadas mais duas

vezes como descrito em PBS 1X pH 7,4, ou até que não houvesse mais sinais de hemólise. A seguir a solução de hemácia foi ajustada para 5% para a imunização dos animais ou 2% para determinação de anticorpos específicos.

3.3.1.2 Solução de hemácia de coelho

Foi coletado um volume de sangue de coelho em um mesmo volume de Alsever's. A seguir o sangue foi centrifugado a 559 g por 5 minutos a temperatura ambiente, e o sobrenadante e a camada de leucócitos foram descartados. As hemácias foram lavadas mais duas vezes como descrito em PBS 1X pH 7,4, ou até que não houvesse mais sinais de hemólise. A seguir a solução de hemácia foi ajustada para 2% para determinação de anticorpos naturais.

3.3.1.3 Determinação do título de anticorpos

Os títulos de anticorpos foram determinados por microhemaglutinação. Foram utilizadas amostras de soro pré-imune (dia 0) e amostras obtidas no dia 37 (7 dias após a segunda imunização) para determinação de anticorpos naturais anti-hemácia de coelho. Para determinação de anticorpos anti-hemácia de carneiro foram utilizadas amostras dos dias 0, 7, 37 e 44. Todas as amostras foram previamente inativadas a 56°C por 30 minutos.

Para microhemaglutinação foram utilizadas microplacas de 96 poços (8 linhas por 12 colunas) com fundo em U. Primeiramente foi adicionado 25 µl PBS 1X pH 7,4 nos poços, em seguida foi adicionado 25 µl do soro dos animais no primeiro poço e feita a diluição seriada (fator 2) até 1:512. Foi acrescentado a cada poço 25 µl de solução de hemácia de coelho ou hemácia de carneiro a 2%. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 1 hora. Os resultados foram expressos como raiz quadrada do recíproco da última diluição que resultou na hemaglutinação das hemácias. Poços contendo 25 µl de PBS no lugar do soro foram utilizados como controle negativo

Para determinação de anticorpos da classe IgY anti-hemácia de carneiro, as amostras foram incubadas com igual volume de 0,2 M 2-mercaptoetanol, preparado em PBS 1X pH 7,4. Em seguida foi feito o processo de microhemaglutinação como

descrito anteriormente. Anticorpos da classe IgM anti-hemácia de carneiro foram estimados pela diferença entre anticorpos totais e anticorpos IgY.

3.3.1.4 Esfregaços sanguíneos

Foram confeccionados esfregaços sanguíneos e corados com solução corante de May-Grunwald Giemsa, conforme Beçak e Paulete (1970), segundo o protocolo:

Foi colocada uma gota pequena de sangue na extremidade direita da lâmina e com a outra mão, foi posicionada outra lâmina contra o sangue formando um ângulo de 45°. Essa outra lâmina foi deslocada da direita para a esquerda em um só movimento, firme, porém suave e uniforme, preservando o ângulo inicial entre as duas lâminas. A lâmina foi seca ao ar. O esfregaço foi coberto com solução corante de May-Grunwald, deixando agir por 5 minutos. Foram adicionadas aproximadamente 20 gotas de água destilada, sem deixar transbordar, deixando agir por 2 minutos e sem lavar, o corante foi eliminado. A lâmina foi coberta com solução corante Giemsa (diluída no momento do uso – 13 gotas da solução estoque para 10 mL de água destilada), deixando agir por 5 minutos. Após isso, a lâmina foi mantida em repouso para escorrer o excedente. A lâmina foi lavada com água destilada, limpando o seu verso com solução álcool-éter (v/v) e seca ao ar livre.

3.3.1.5 Hemograma

Os procedimentos metodológicos de rotina para realização do hemograma completo do sangue periférico coletado foram realizados conforme Jain (1986).

A contagem total de hemácias foi realizada pelo método manual com o uso do hemocítmetro, diluindo-se o sangue em solução fisiológica tamponada na proporção 1:200. A concentração da hemoglobina foi determinada pelo método da cianometahemoglobina e o volume globular pelo método do microhematócrito.

A contagem total de leucócitos foi realizada por hemocítmetro, diluindo-se o sangue com o líquido de Türk (ácido acético glacial a 2%, violeta de genciana a 1% em água destilada) em uma proporção 1:20. A leucometria diferencial

foi determinada em esfregaço sangüíneo corado por panótico rápido (Merck).

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados, e o teste de Bartlett para verificar a homogeneidade dos dados. Como os dados não atenderam os pressupostos de normalidade e homogeneidade os resultados foram submetidos aos testes não paramétricos. Para comparação entre aves de posturas e de corte, entre as linhagens de corte (TT e LLc) e entre machos e fêmeas da mesma linhagem foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para comparar as linhagens de postura (MM, CC e CCc) foi utilizado do teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. Para a análise da atividade antibacteriana do soro em ágar foi aplicado o teste de regressão logística. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

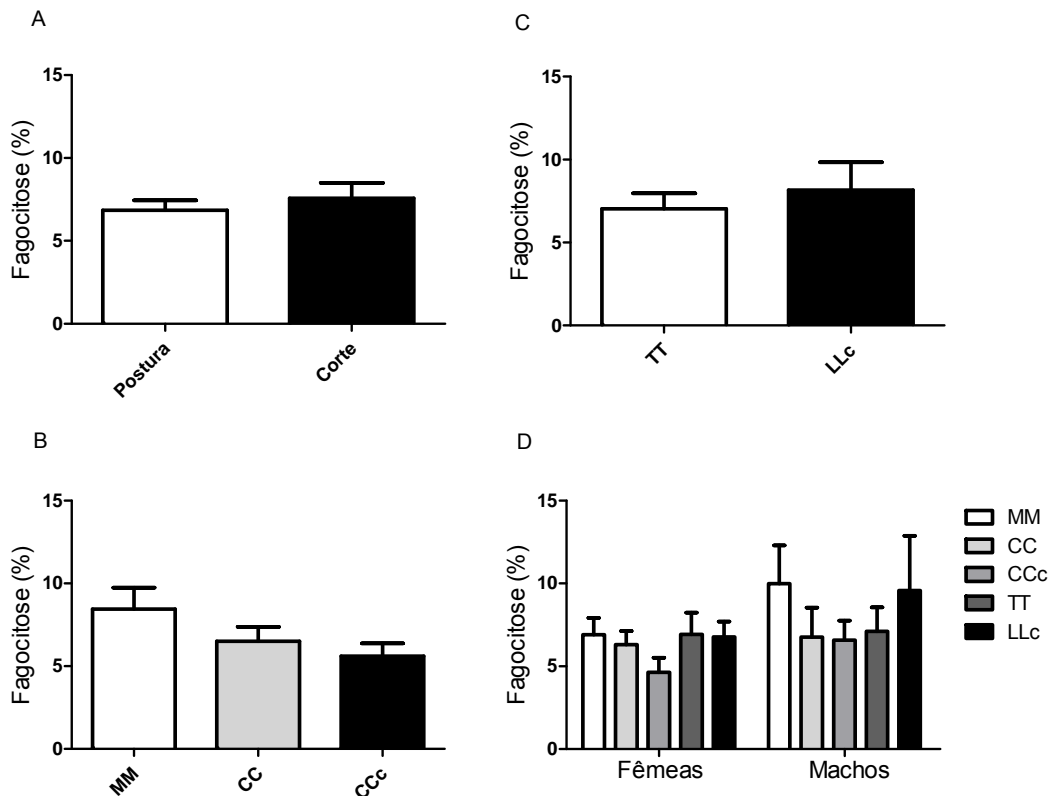
4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO I

4.1.1 Atividade Fagocítica

A figura 1 mostra o resultado da atividade fagocítica de macrófagos abdominais. Foi observado que a porcentagem de macrófagos abdominais que fagocitaram bactérias não foi diferente significativamente entre as aves de postura e de corte (Figura 1 A). Em galinhas poedeiras não foi encontrada diferença entre as linhagens estudadas (Figura 1 B), e em frangos de corte também não houve diferença significativa (Figura C). O sexo também não influenciou a atividade fagocítica (Figura 1D).

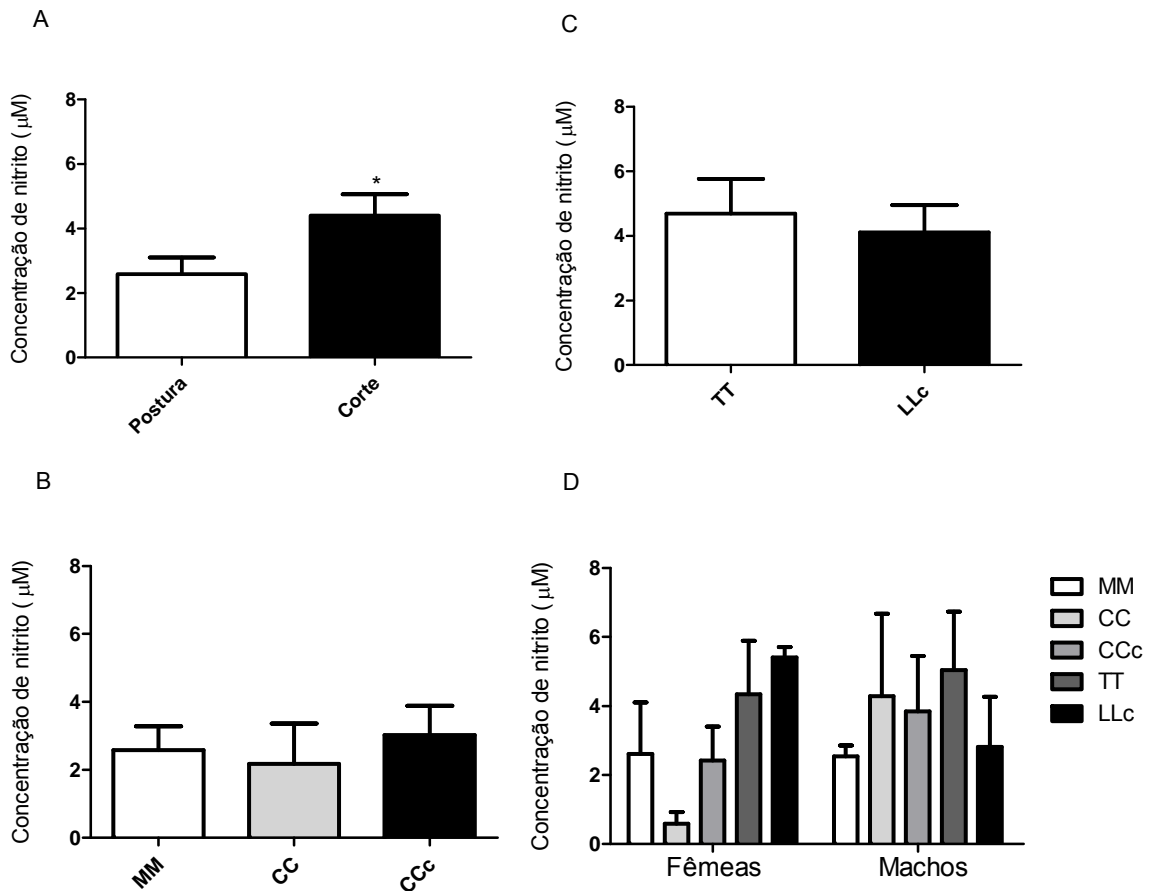
Figura 1 - Atividade fagocítica de macrófagos abdominais. (A) Porcentagem de fagocitose por macrófagos de aves das linhagens de posturas e de corte. (B) Porcentagem de fagocitose por macrófagos em galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc. (C) Porcentagem de fagocitose por macrófagos de frangos de corte das linhagens TT e LLc. (D) Porcentagem de fagocitose por macrófagos de aves fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc. As barras sobre as colunas indicam o erro padrão da média.



4.1.2 Produção de Óxido Nítrico por Macrófagos

Quanto à produção de NO foi observado que macrófagos de frangos de corte produziram mais NO que galinhas poedeiras (Figura 2 A). Analisando as linhagens de galinhas poedeiras (MM, CC e CCc) e as linhagens de frangos de corte (TT e LLc) a produção de NO foi semelhante (Figura 2 B e C). Entre machos e fêmeas da mesma linhagem também não foi encontrada diferença significativa (Figura 2 D).

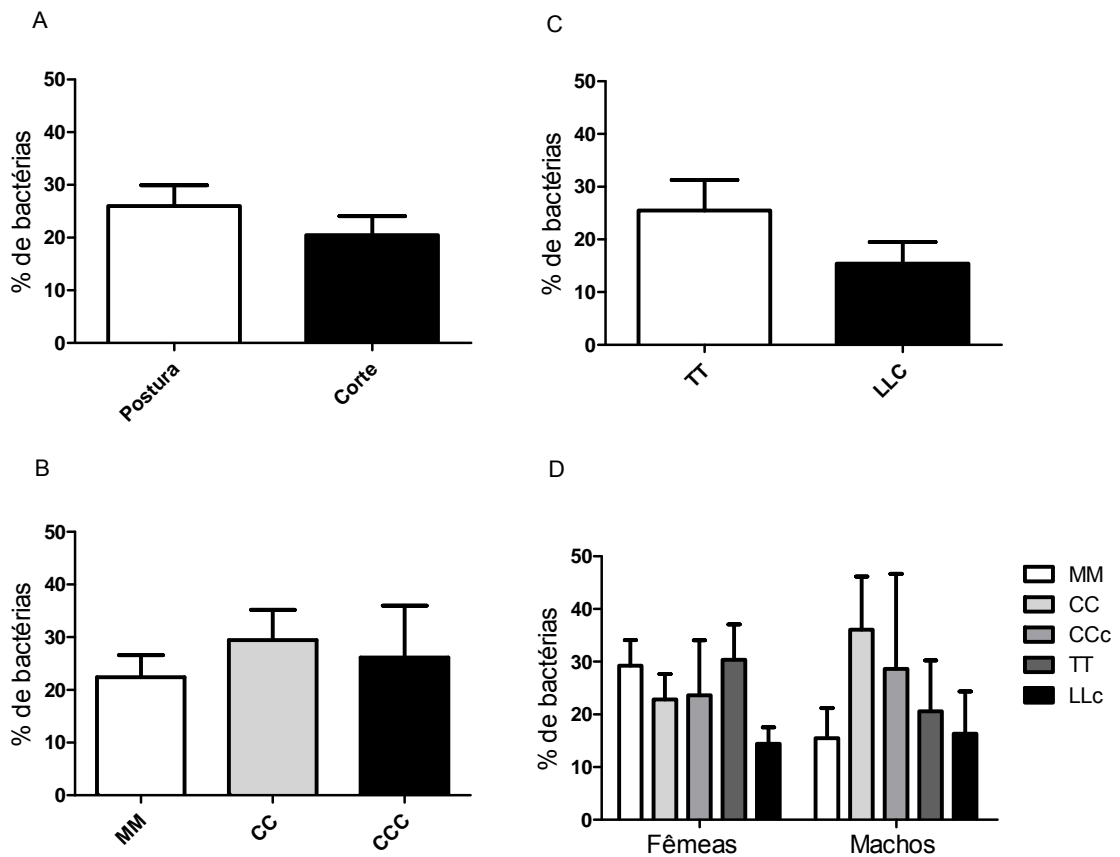
Figura 2 - Produção de NO por macrófagos abdominais. (A) Produção de NO por macrófagos de aves das linhagens de posturas e de corte. * indica diferença significativa, $p < 0,05$. (B) Produção de NO por macrófagos em galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc. (C) Produção de NO por macrófagos de frangos de corte das linhagens TT e LLc, (D) Produção de NO por macrófagos de aves fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc. As barras sobre as colunas indicam o erro padrão da média.



4.1.3 Atividade Antibacteriana de Macrófagos Abdominais

A porcentagem de bactérias mortas por macrófagos está mostrada na Figura 3. Os resultados mostram que não houve diferença na atividade antibacteriana entre as galinhas poedeiras e os frangos de corte (Figura 3 A). O mesmo pode ser observado entre as linhagens de postura e de corte (Figura 3 B e C). Entre machos e fêmeas da mesma linhagem também não houve diferença significativa (Figura 3 D).

Figura 3 - Atividade antibacteriana de macrófagos abdominais. (A) Porcentagem de bactérias mortas por macrófagos de aves das linhagens de posturas e de corte. (B) Porcentagem de bactérias mortas por macrófagos em galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc. (C) Porcentagem de bactérias mortas por macrófagos de frangos de corte das linhagens TT e LLc, (D) Porcentagem de bactérias mortas por macrófagos de aves fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc. As barras sobre as colunas indicam o erro padrão da média.



4.1.4 Atividade Antibacteriana do Soro em Ágar

A atividade antibacteriana do soro foi avaliada pela presença do halo de inibição de crescimento bacteriano. Os resultados são mostrados nas tabelas seguintes a qual indica o número de animais que apresentaram halo de inibição. Não foi encontrada diferença significativa entre as aves de postura e de corte (Tabela 1). Entre os animais de postura (MM, CC e CCc) e de corte (TT e LLc), não houve diferença significativa (Tabela 2 e 3). Em relação a machos e fêmeas da mesma linhagem também não foi encontrada diferença (Tabela 4).

Tabela 1– Presença do halo de inibição em aves de linhagens de postura e de corte.

Linhagem	n	<i>E. coli</i> K12 711	<i>E. coli</i> K12 HB
Postura	30	8	12
Corte	20	3	3

n=número de animais por linhagem.

Tabela 2– Presença do halo de inibição em galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc.

Linhagem	n	<i>E. coli</i> K12 711	<i>E. coli</i> K12 HB
MM	10	3	5
CC	10	3	4
CCc	10	2	3

n=número de animais por linhagem.

Tabela 3– Presença do halo de inibição em frangos de corte das linhagens TT e LLc.

Linhagem	n	<i>E. coli</i> K12 711	<i>E. coli</i> K12 HB
TT	10	0	0
LLc	10	3	3

n=número de animais por linhagem.

Tabela 4 – Presença do halo de inibição em fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc.

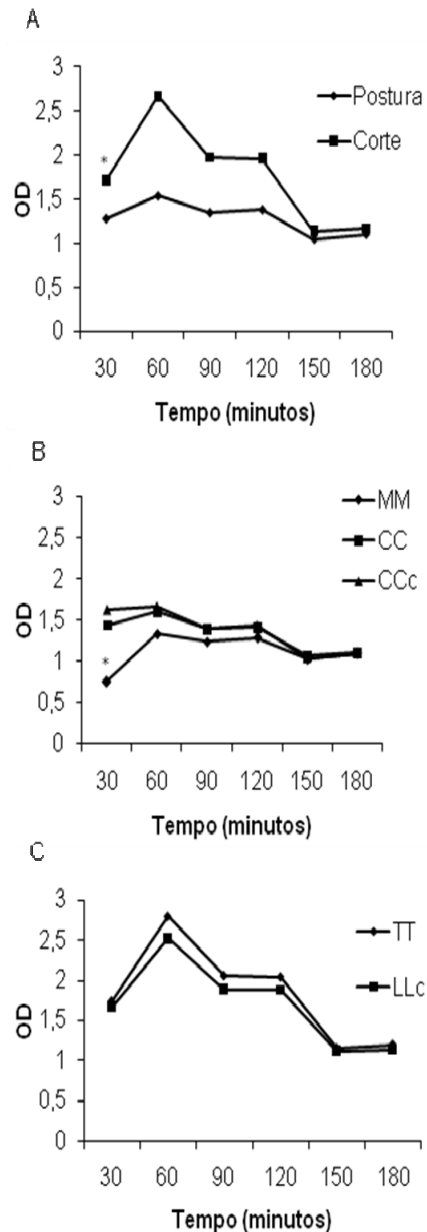
Linhagem	n	<i>E. coli</i> K12 711	<i>E. coli</i> K12 HB
MM fêmeas	5	3	5
MM machos	5	0	0
CC fêmeas	5	3	4
CC machos	5	0	0
CCc fêmeas	5	1	2
CCc machos	5	1	1
TT fêmeas	5	0	0
TT machos	5	0	0
LLc fêmeas	5	1	1
LLc machos	5	2	2

n=número de animais por linhagem.

4.1.5 Resistência Sérica

O resultado do experimento de resistência sérica mostra que as aves de postura apresentam uma melhor resposta com 30 minutos de incubação, nos demais momentos não houve diferença significativa. O mesmo pode ser observado quando comparadas as três linhagens de postura, onde a MM apresentou melhor resposta que a CC e CCc. Quanto às linhagens de corte, TT e LLc, não houve diferença significativa (Figura 4).

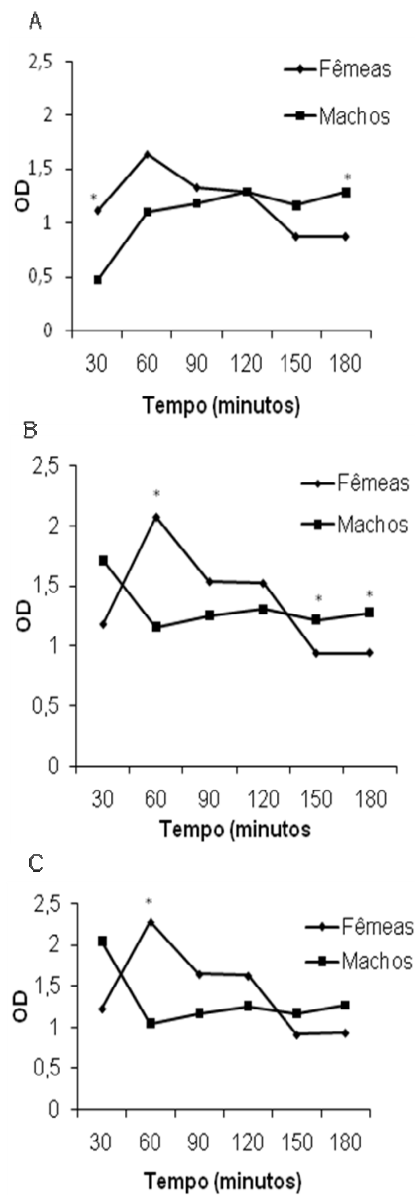
Figura 4 – Resistência sérica com 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos de incubação. (A) Resistência sérica em aves das linhagens de posturas e de corte. * indica diferença significativa. (B) Resistência sérica em galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc. * indica diferença significativa em relação à linhagem CC e CCc. (C) Resistência sérica em frangos de corte das linhagens TT e LLc. $p < 0,05$.



Comparando machos e fêmeas da mesma linhagem foi observado que, entre as linhagens de postura, machos da linhagem MM responderam melhor que as fêmeas após 30 minutos de incubação, porém após 180 minutos de incubação as fêmeas tiveram melhor resposta. Machos da linhagem CC responderam melhor com 60 minutos de incubação, enquanto as fêmeas

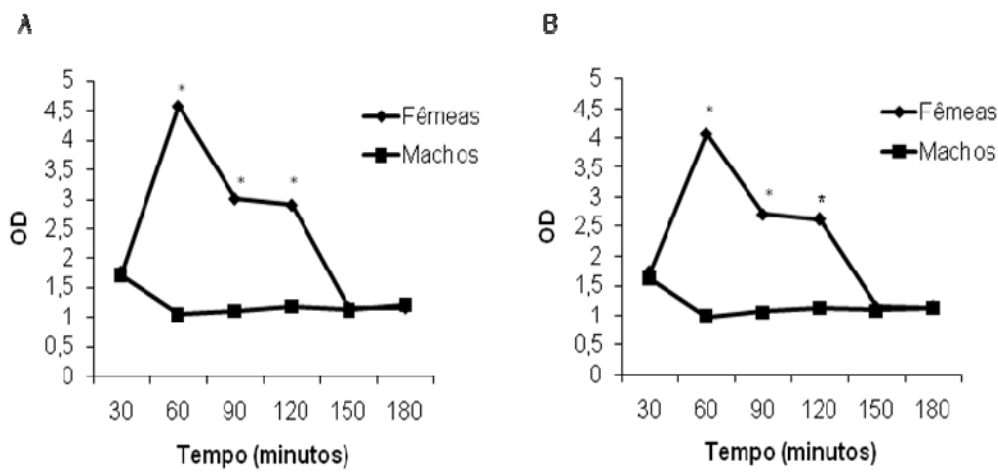
apresentaram melhor resposta após 150 e 180 minutos de incubação. Na linhagem CCc foi observado que os machos responderam melhor que as fêmeas após 60 minutos (Figura 5).

Figura 5 – Resistência sérica em machos e fêmeas das linhagens de postura com 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos de incubação. (A) Resistência sérica em galinhas poedeiras da linhagem MM, (B) Resistência sérica em galinhas poedeiras da linhagem CC. (C) Resistência sérica em galinhas poedeiras da linhagem CCc. * indica diferença significativa, $p < 0,05$.



Entre as linhagens de corte os machos responderam melhor que as fêmeas após 60, 90 e 120 minutos de incubação. Após 150 e 180 minutos os resultados foram semelhantes entre machos e fêmeas (Figura 6).

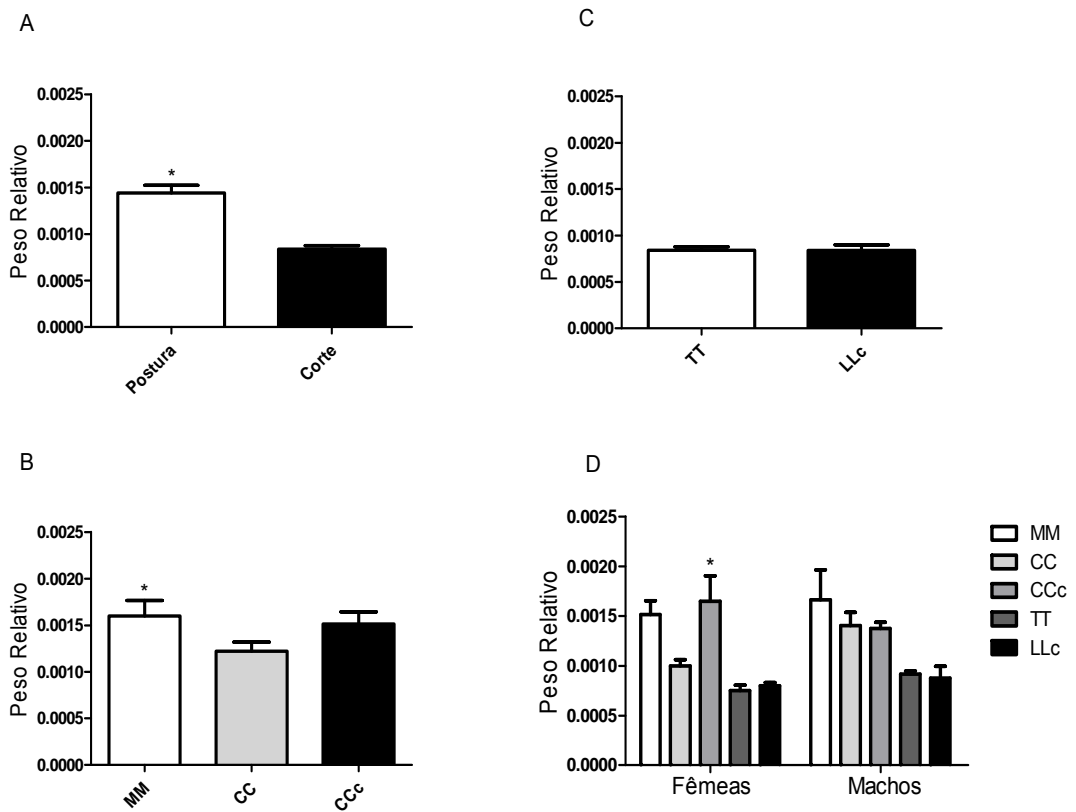
Figura 6 – Resistência sérica em machos e fêmeas das linhagens de corte com 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos de incubação. (A) Resistência sérica em frangos de corte da linhagem TT, (B) Resistência sérica em frangos de corte da linhagem LLc. * indica diferença significativa, $p < 0,05$.



4.1.6 Peso Relativo do Baço

A Figura 7A mostra que o peso relativo do baço das galinhas poedeiras foi maior que dos frangos de corte. Entre as linhagens de postura, animais da linhagem MM apresentaram peso relativo do baço maior que animais da linhagem CC (Figura 7B). Em frangos de corte não foi encontrado diferença entre as linhagens (Figura 7C). Quanto ao sexo foi observado que fêmeas da linhagem CC tiveram peso maior que os machos da mesma linhagem, enquanto na linhagem TT, o peso relativo do baço das fêmeas foi menor que dos machos (Figura 7D).

Figura 7 - Peso relativo do baço. (A) Peso relativo do baço de aves das linhagens de posturas e de corte. * indica diferença significativa. (B) Peso relativo do baço em galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc. * indica diferença significativa em relação à linhagem CC. (C) Peso relativo do baço de frangos de corte das linhagens TT e LLc, (D) Peso relativo do baço de fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc. * indica diferença significativa em relação aos machos da mesma linhagem. $p < 0,05$. As barras sobre as colunas indicam o erro padrão da média.

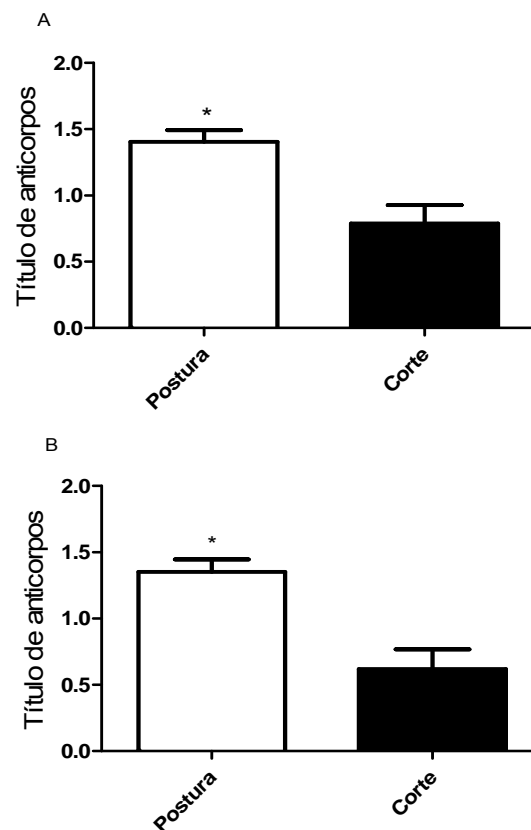


4.2 EXPERIMENTO II

4.2.1 Títulos de Anticorpos Anti-hemácia de Carneiro

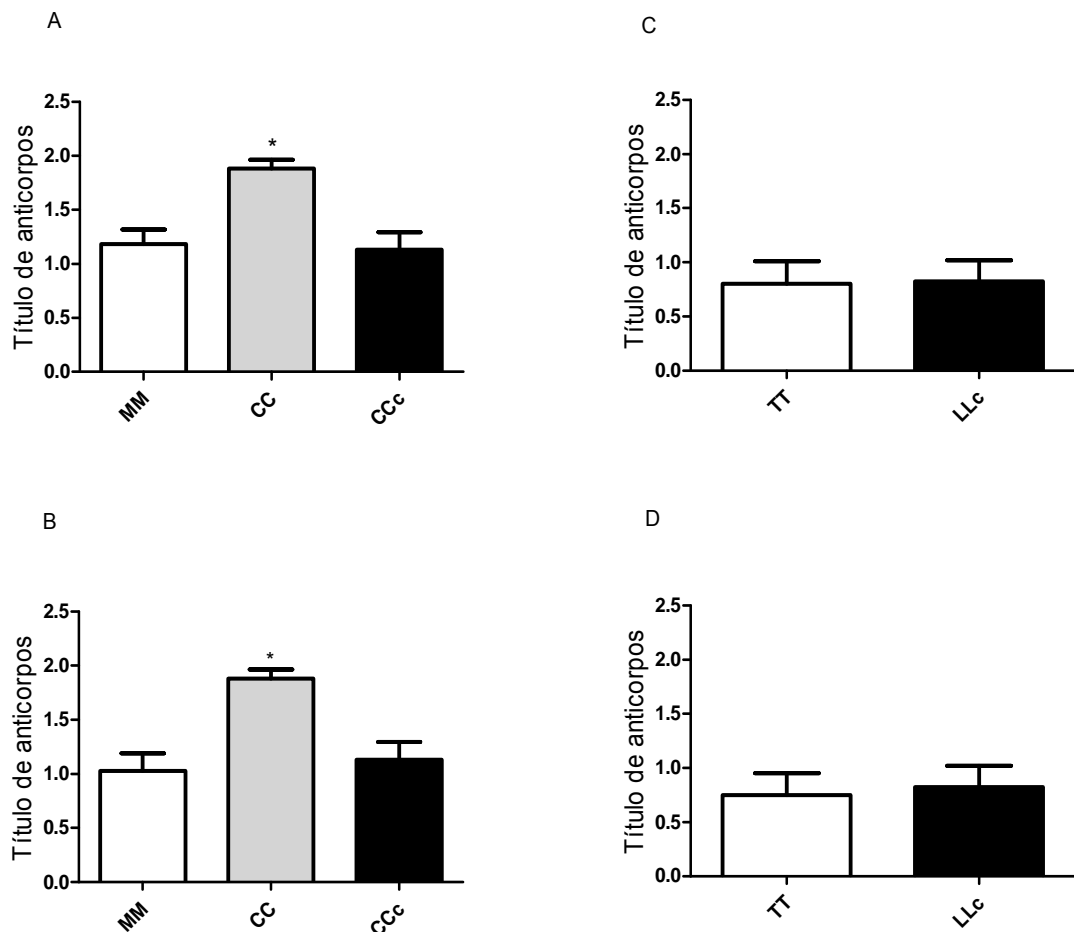
A determinação dos títulos de anticorpos contra hemácias de carneiro foi realizada com amostras obtidas nos dias 0, 7, 37 e 44. No momento pré-imune (dia 0) as aves de postura tiveram títulos de anticorpos contra hemácias de carneiro maiores que os frangos de corte (Figura 8 A). Os anticorpos encontrados neste período são da classe IgM (Figura 8 B), pois quando as amostras foram incubadas com 2-mercaptoetanol, os resultados foram negativos (dados não mostrados).

Figura 8 – Títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro em aves de linhagens de postura e linhagens de corte no dia 0. (A) Títulos de anticorpos totais. (B) Títulos de anticorpos IgM. * indica diferença significativa, $p < 0,05$. As barras sobre as colunas indicam o erro padrão da média.



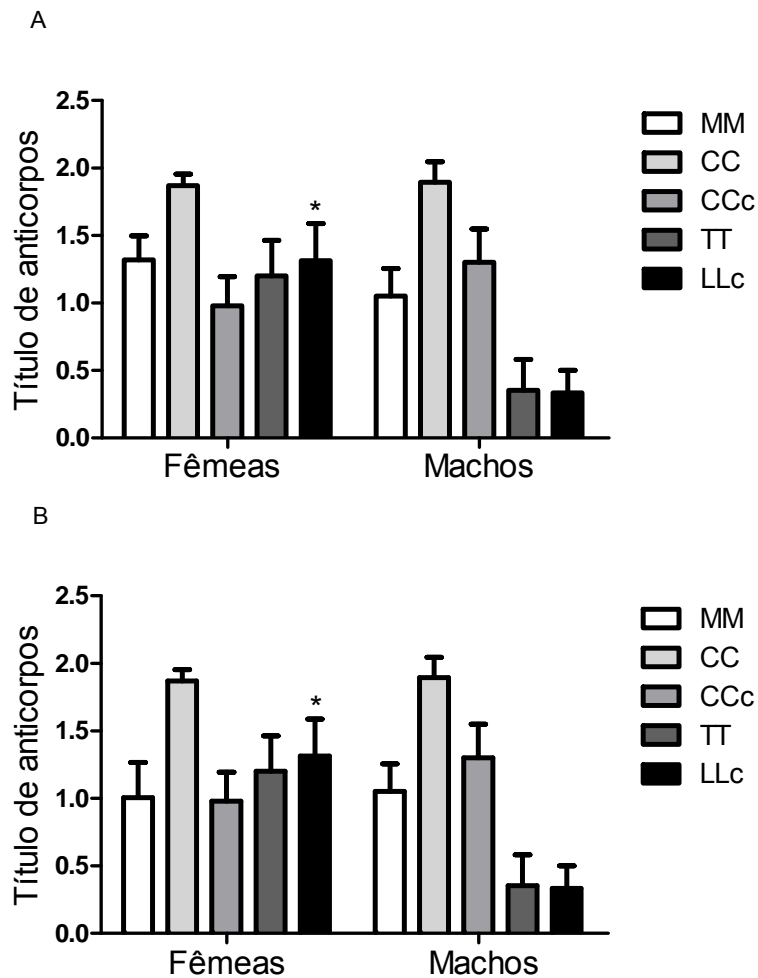
Entre as linhagens de galinhas poedeiras a linhagem CC apresentou maiores títulos de anticorpos que as demais linhagens, no dia 0, tanto para anticorpos totais quanto para IgM (Figura 9 A e B). Não foi encontrado diferença entre as linhagens de frangos de corte (Figura 9 C e D).

Figura 9 – Títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro em aves das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc no dia 0. (A) Títulos de anticorpos totais em galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc. (B) Títulos de anticorpos IgM em galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc. * indica diferença significativa em relação à linhagem MM e CCc, $p < 0,05$. (C) Títulos de anticorpos totais em frangos de corte das linhagens TT e LLc. (D) Títulos de anticorpos IgM em frangos de corte das linhagens TT e LLc. As barras sobre as colunas indicam o erro padrão da média.



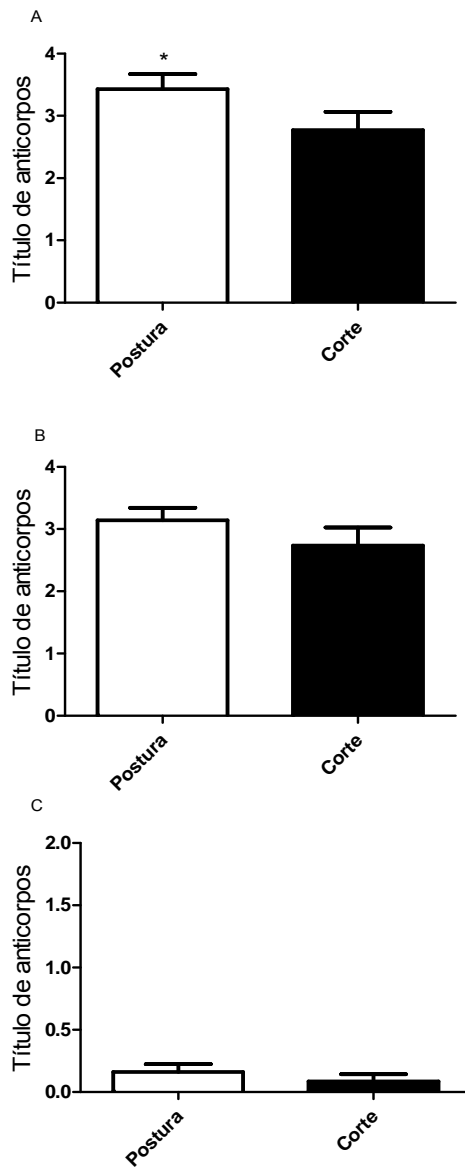
Em relação ao sexo, no dia 0, foi observado que fêmeas da linhagem LLc produziram mais anticorpos totais e IgM que os machos da mesma linhagem (Figura 10 A e B).

Figura 10 – Títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro em fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc no dia 0. (A) Títulos de anticorpos totais em aves fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc. (B) Títulos de anticorpos IgM em aves fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc. * indica diferença significativa em relação aos machos da mesma linhagem, $p < 0,05$. As barras sobre as colunas indicam o erro padrão da média.



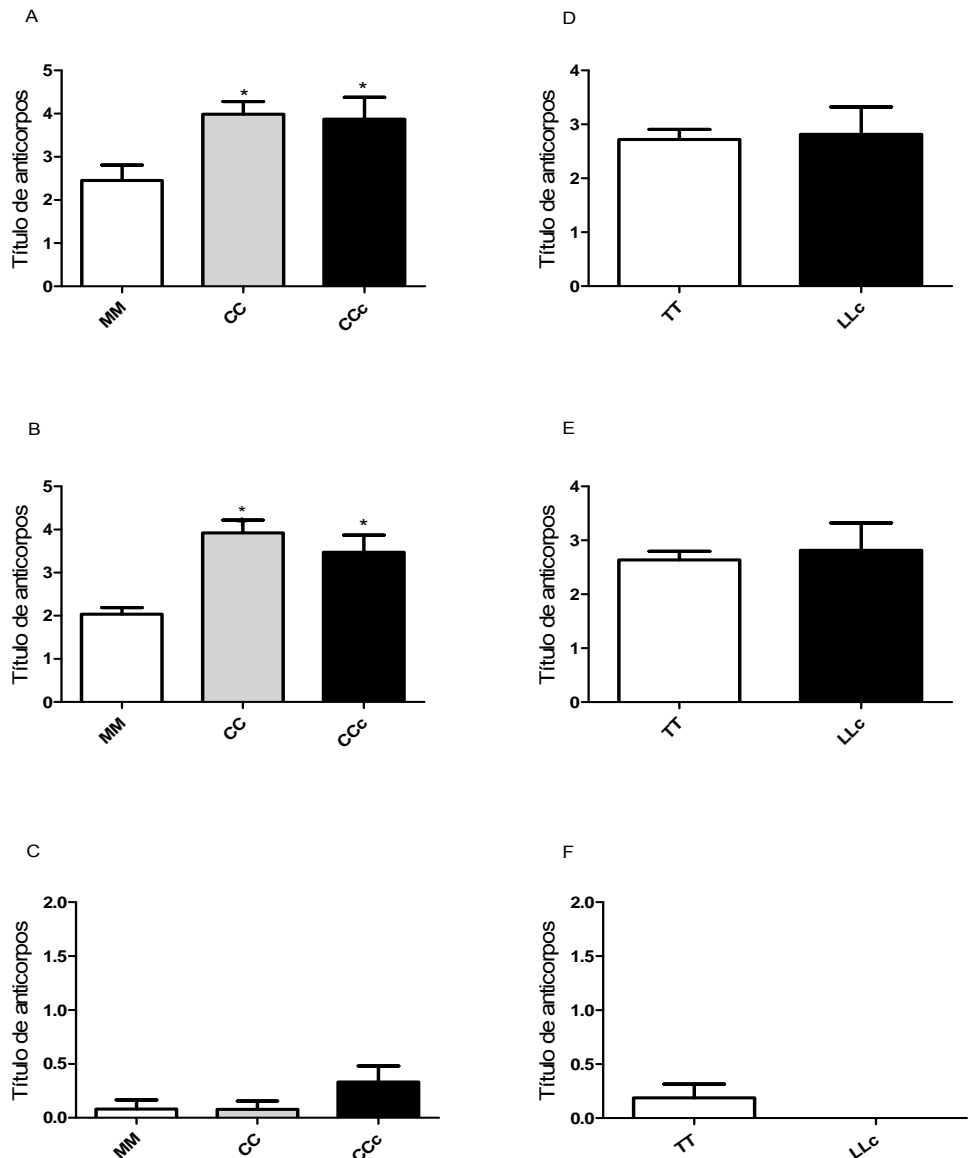
No 7º dia, os animais de postura apresentaram maiores títulos de anticorpos totais que os animais de corte (Figura 11 A). A classe de anticorpos encontrados foram sobretudo da classe IgM (Figura 11 B e C).

Figura 11 – Títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro em aves de linhagens de postura e linhagens de corte no dia 7. (A) Títulos de anticorpos totais. (B) Títulos de anticorpos IgM. (C) Títulos de anticorpos IgY. * indica diferença significativa, $p < 0,05$. As barras sobre as colunas indicam o erro padrão da média.



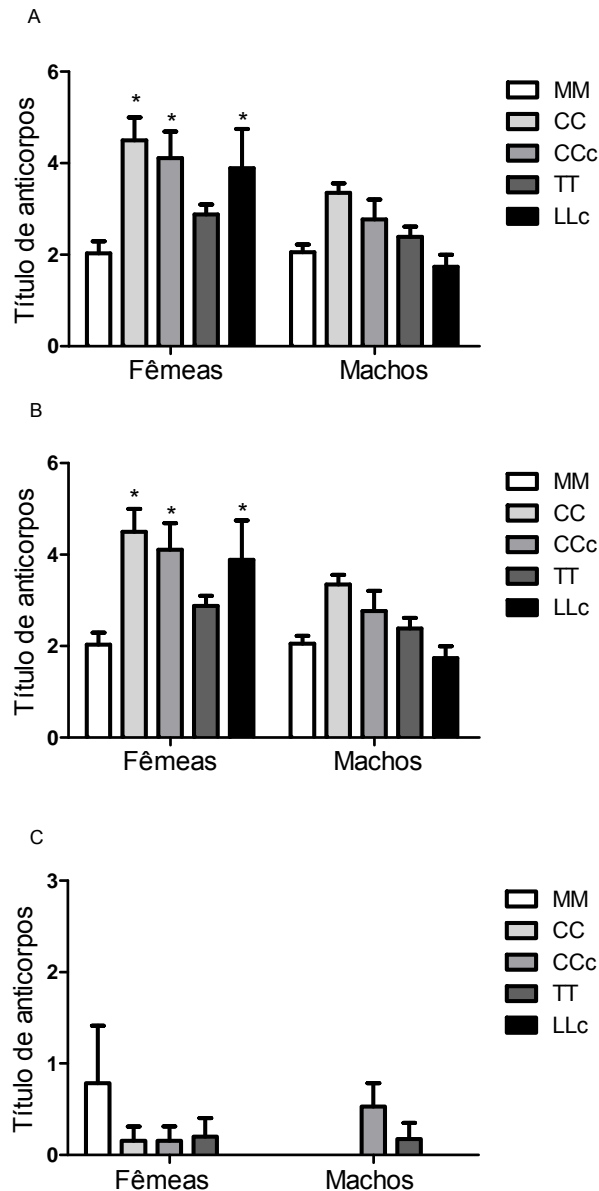
Nas aves de postura, no dia 7, foi observado que as linhagens CC e CCc produziram mais anticorpos totais e IgM. Em frangos de corte não foi encontrada diferença significativa entre as linhagens (Figura 12).

Figura 12 – Títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro em aves das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc no dia 7. (A) Títulos de anticorpos totais em galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc. (B) Títulos de anticorpos IgM em galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc. (C) Títulos de anticorpos IgY em galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc. (D) Títulos de anticorpos totais em frangos de corte das linhagens TT e LLc. (E) Títulos de anticorpos IgM em frangos de corte das linhagens TT e LLc. (F) Títulos de anticorpos IgY em frangos de corte das linhagens TT e LLc. * indica diferença significativa em relação à linhagem MM, $p < 0,05$. As barras sobre as colunas indicam o erro padrão da média.



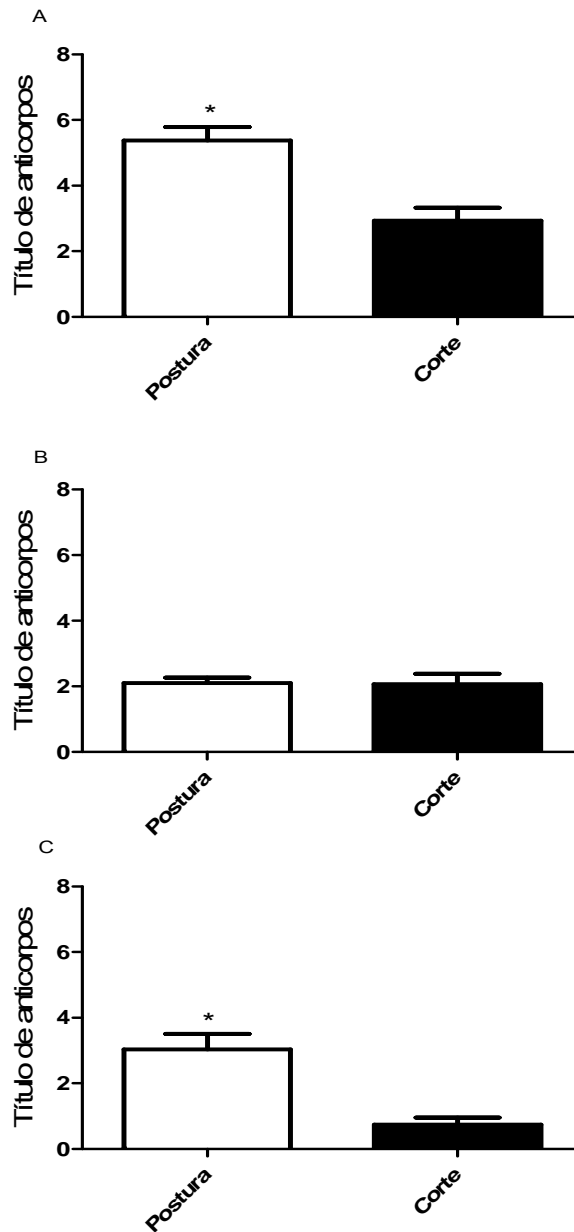
Quanto ao sexo, no 7º dia, tem sido observado que fêmeas das linhagens CC, CC e LLc apresentaram maiores níveis de anticorpos totais e IgM que os machos da mesma linhagem (Figura 13).

Figura 13 – Títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro em fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc no dia 7. (A) Títulos de anticorpos totais em aves fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc. (B) Títulos de anticorpos IgM em aves fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc. (C) Títulos de anticorpos IgY em aves fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc. * indica diferença significativa em relação aos machos da mesma linhagem, $p < 0,05$. As barras sobre as colunas indicam o erro padrão da média.



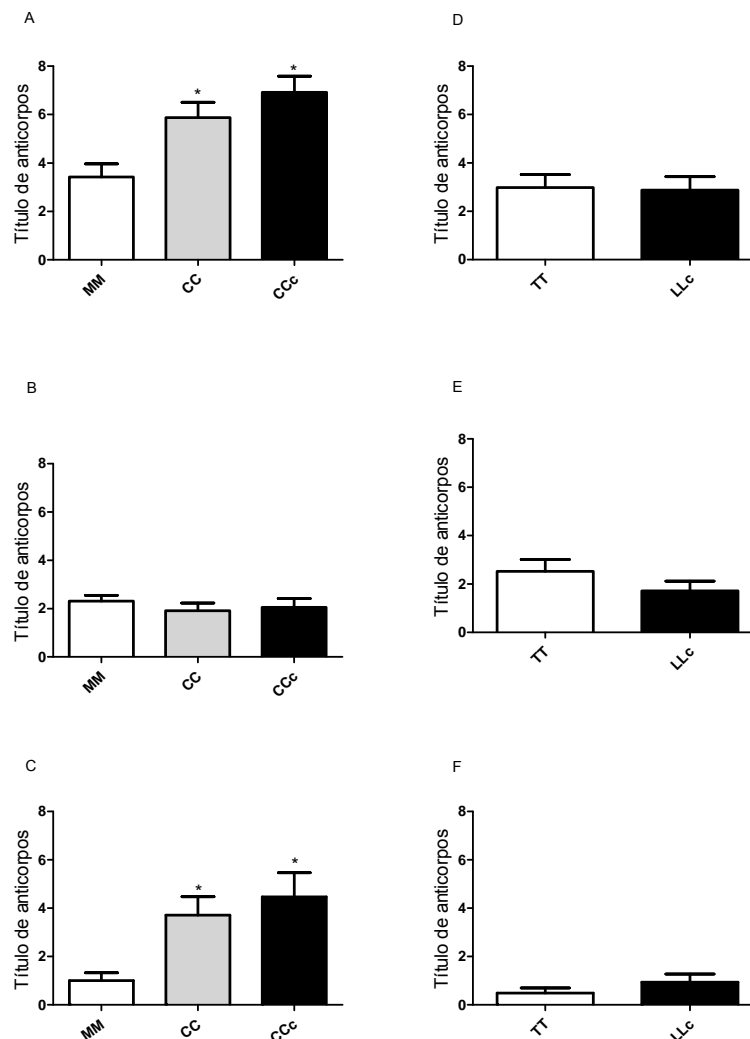
No dia 37, os animais de postura tiveram maiores títulos de anticorpos totais que os animais de corte. Neste período os anticorpos presentes foram principalmente da classe IgY, onde os níveis de anticorpos também foram significativamente maiores nos animais de postura. Quanto à IgM não houve diferença significativa (Figura 14).

Figura 14 – Títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro em aves de linhagens de postura e linhagens de corte no dia 37. (A) Títulos de anticorpos totais. (B) Títulos de anticorpos IgM. (C) Títulos de anticorpos IgY. * indica diferença significativa, $p < 0,05$. As barras sobre as colunas indicam o erro padrão da média.



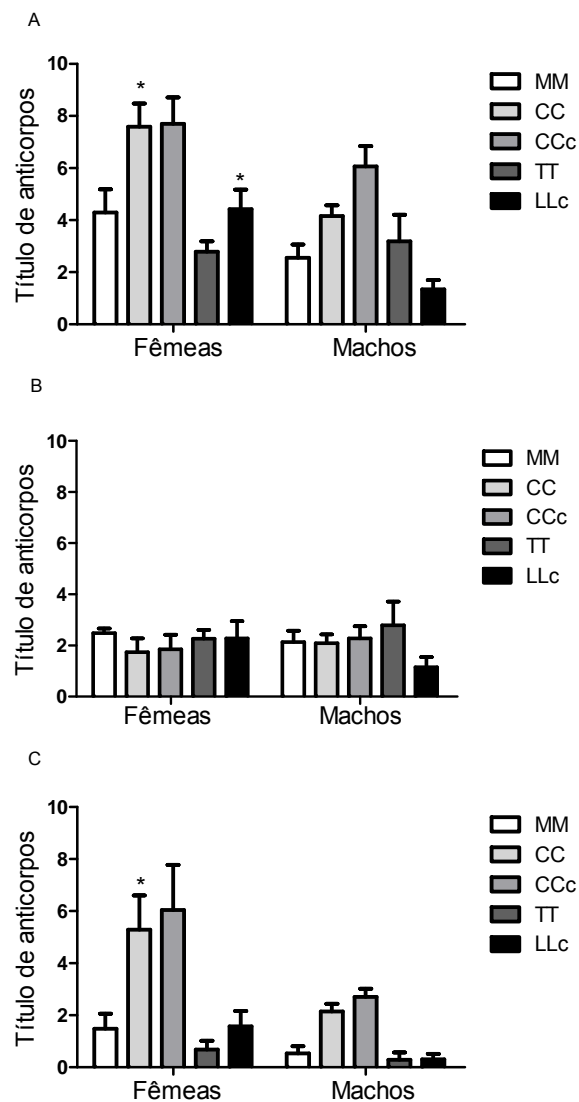
No 37º dia, aves de postura das linhagens CC e CCc apresentaram títulos de anticorpos totais e IgY maiores que a linhagem MM, enquanto os níveis de IgM foi semelhante entre as linhagens. Não foi encontrada diferença significativa entre as linhagens de corte (Figura 15).

Figura 15 – Títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro em aves das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc no dia 37. (A) Títulos de anticorpos totais em galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc. (B) Títulos de anticorpos IgM em galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc. (C) Títulos de anticorpos IgY em galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc. * indica diferença significativa em relação à linhagem MM, $p < 0,05$. (D) Títulos de anticorpos totais em frangos de corte das linhagens TT e LLc. (E) Títulos de anticorpos IgM em frangos de corte das linhagens TT e LLc. (F) Títulos de anticorpos IgY em frangos de corte das linhagens TT e LLc. As barras sobre as colunas indicam o erro padrão da média.



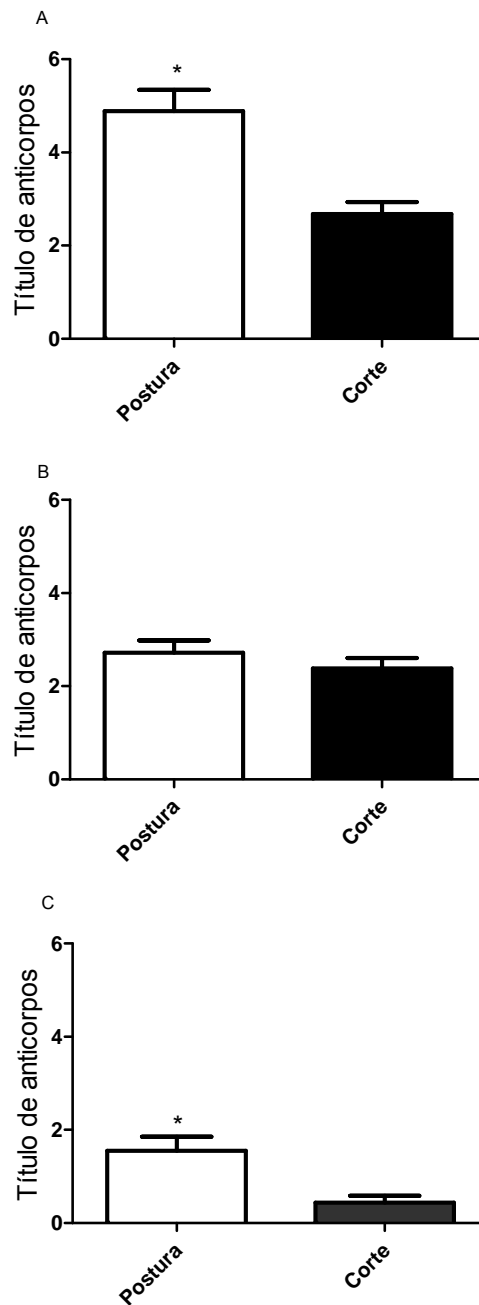
Analisando o efeito do sexo, no dia 37, pode ser observado que fêmeas das linhagens CC e LLc produziram mais anticorpos totais que os machos da mesma linhagem. E ainda as fêmeas da linhagem CC tiveram níveis de IgY maiores que os machos. A produção de IgM foi semelhante entre machos e fêmeas da mesma linhagem (Figura 16).

Figura 16 – Títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro em fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc no dia 37. (A) Títulos de anticorpos totais em aves fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc. (B) Títulos de anticorpos IgM em aves fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc. (C) Títulos de anticorpos IgY em aves fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc. * indica diferença significativa em relação aos machos da mesma linhagem, $p < 0,05$. As barras sobre as colunas indicam o erro padrão da média.



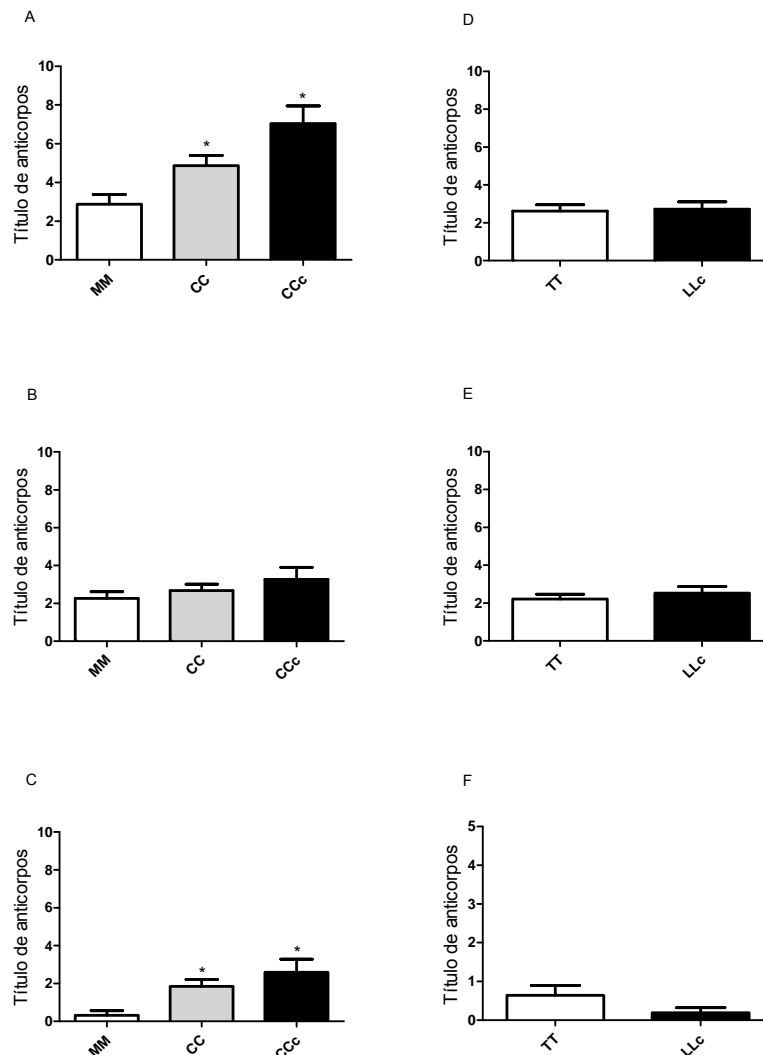
Os resultados das amostras obtidas aos 44 dias mostram que aves de postura tiveram maiores níveis de anticorpos totais e IgY que as aves de corte. Não houve diferença significativa quanto à IgM (Figura 17).

Figura 17 – Títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro em aves de linhagens de postura e linhagens de corte no dia 44. (A) Títulos de anticorpos totais. (B) Títulos de anticorpos IgM. (C) Títulos de anticorpos IgY. * indica diferença significativa, $p < 0,05$. As barras sobre as colunas indicam o erro padrão da média.



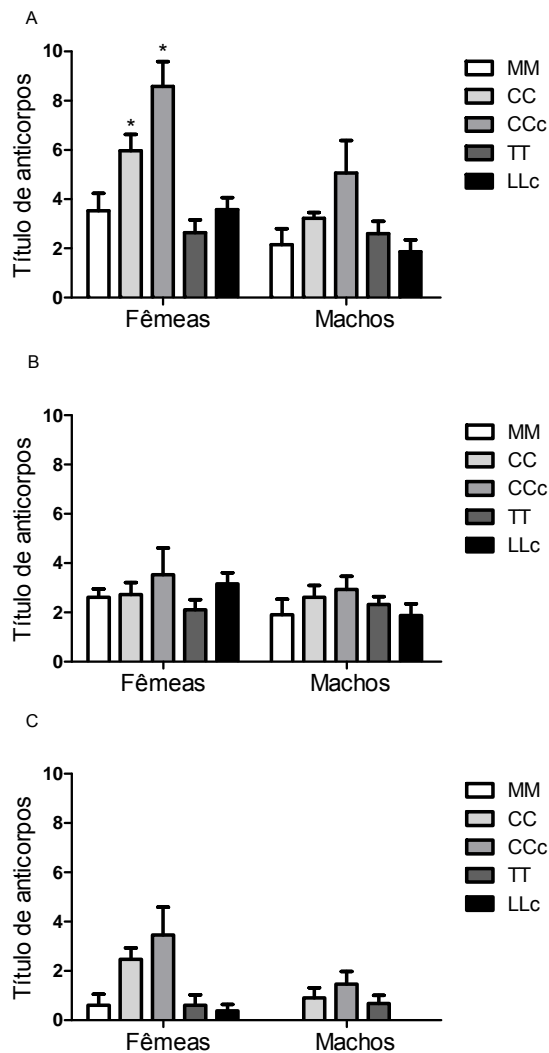
No dia 44, dentre as galinhas poedeiras, as linhagens CC e CCc produziram maiores níveis de anticorpos totais e IgY que a linhagem MM. Os níveis de anticorpos IgM foram semelhantes entre as linhagens. Em relação aos frangos de corte não houve diferença significativa entre as linhagens (Figura 18).

Figura 18 – Títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro em aves das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc no dia 44. (A) Títulos de anticorpos totais em galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc. (B) Títulos de anticorpos IgM em galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc. (C) Títulos de anticorpos IgY em galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc. * indica diferença significativa em relação à linhagem MM, $p < 0,05$. (D) Títulos de anticorpos totais em frangos de corte das linhagens TT e LLc. (E) Títulos de anticorpos IgM em frangos de corte das linhagens TT e LLc. (F) Títulos de anticorpos IgY em frangos de corte das linhagens TT e LLc. As barras sobre as colunas indicam o erro padrão da média.



Em relação ao sexo, nas amostras obtidas no dia 44, tem sido observado que houve uma maior produção de anticorpos totais em fêmeas das linhagens CC, CCc e LLc que em machos da mesma linhagem. A produção de IgY também foi maior nas fêmeas das linhagens CCc e LLc que em machos. Não houve diferenças significativa quanto à IgM entre fêmeas e machos. (Figura 19).

Figura 19 – Títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro em fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc no dia 44. (A) Títulos de anticorpos totais em aves fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc. (B) Títulos de anticorpos IgM em aves fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc. (C) Títulos de anticorpos IgY em aves fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CCc, TT e LLc. * indica diferença significativa em relação aos machos da mesma linhagem, $p < 0,05$. As barras sobre as colunas indicam o erro padrão da média.



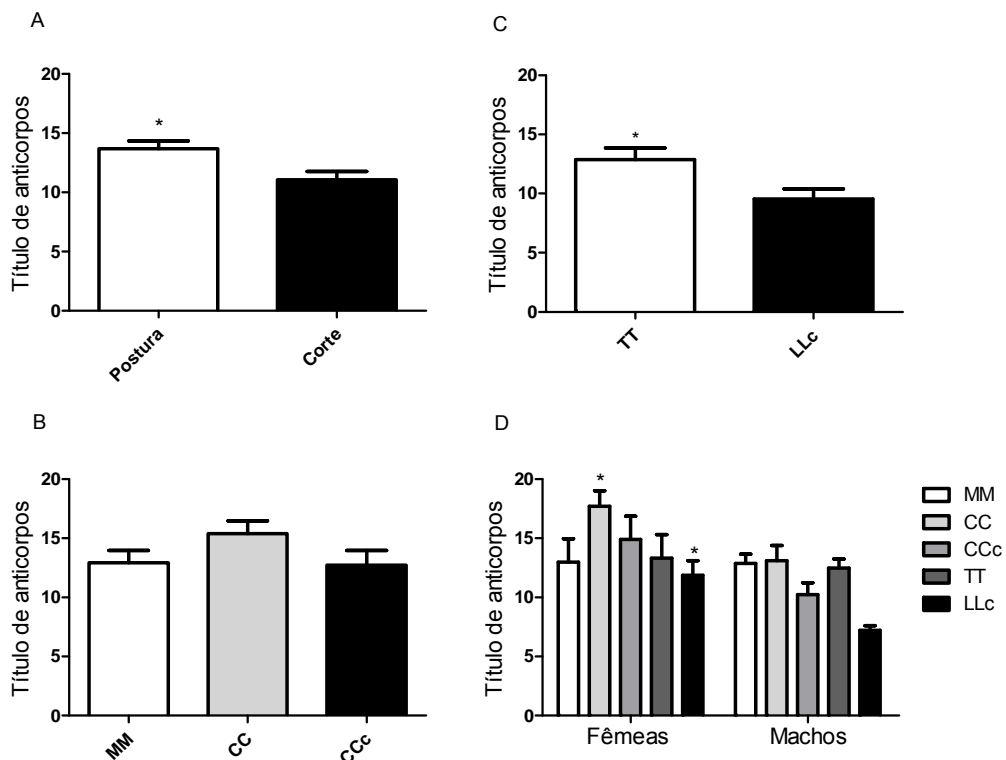
4.2.2 Títulos de Anticorpos Naturais Anti-hemácia de Coelho

Para determinar os títulos de anticorpos naturais anti-hemácia de coelho foram utilizadas amostras obtidas nos dia 0 e 37. No soro pré-imune animais de postura apresentaram maiores níveis de anticorpos que os animais da linhagem de corte (Figura 20 A).

Em galinhas poedeiras não foi encontrado diferença significativa entre as linhagens. Em frangos de corte foi observado que animais da linhagem TT produziram mais anticorpos que os animais da linhagem LLc (Figura 20 B e C).

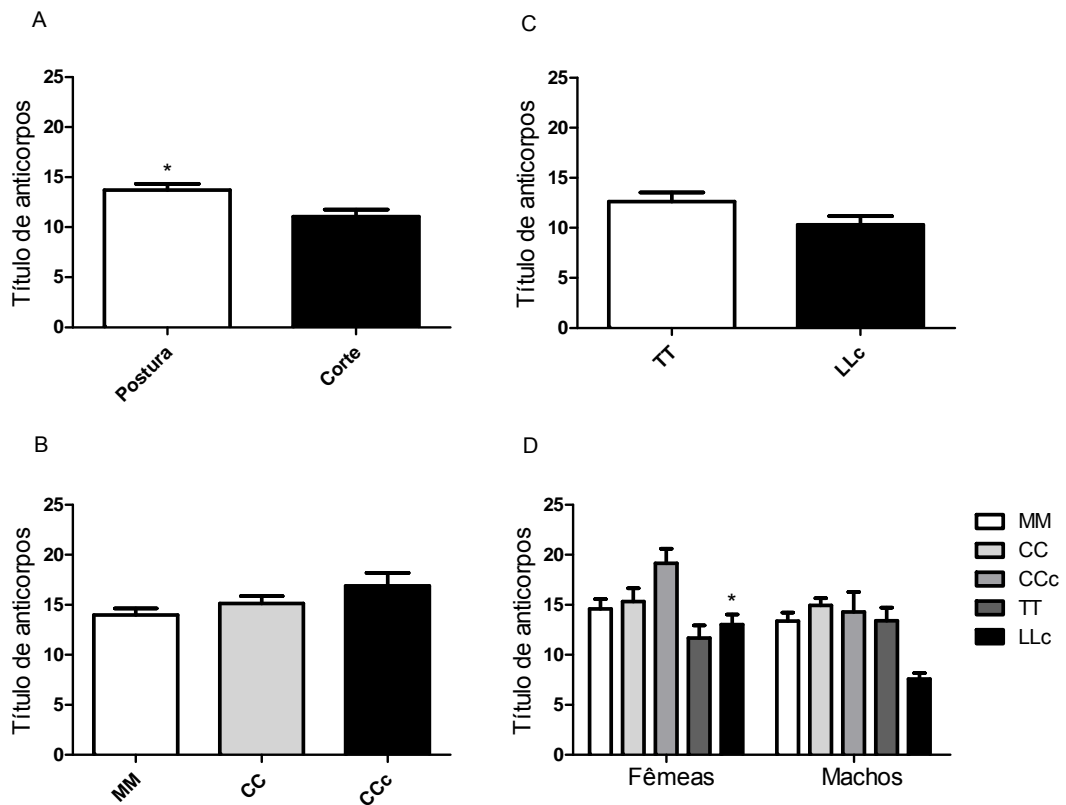
Foi observado também que fêmeas das linhagens CC e LLc tiveram maiores níveis de anticorpos que os machos (Figura 20 D).

Figura 20 – Títulos de anticorpos naturais anti-hemácia de coelho no dia 0. (A) Títulos de anticorpos em aves de linhagens de postura e linhagens de corte. * indica diferença significativa (B) Títulos de anticorpos em galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc. (C) Títulos de anticorpos em frangos de corte das linhagens TT e LLc. (D) Títulos de anticorpos em aves fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CC, TT e LLc. * indica diferença significativa em relação aos machos da mesma linhagem, $p < 0,05$. As barras sobre as colunas indicam o erro padrão da média.



No 37º dia os títulos de anticorpos naturais foram maiores em aves de postura que em aves de corte. Entre as linhagens de galinhas poedeiras e de frangos de corte não houve diferença significativas. Neste período as fêmeas da linhagem LLc apresentaram maiores níveis de anticorpos que os machos (Figura 21).

Figura 21 – Títulos de anticorpos naturais anti-hemácia de coelho no dia 37. (A) Títulos de anticorpos em aves de linhagens de postura e linhagens de corte. * indica diferença significativa (B) Títulos de anticorpos IgM em galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc. (C) Títulos de anticorpos em frangos de corte das linhagens TT e LLc. (D) Títulos de anticorpos em aves fêmeas e machos das linhagens MM, CC, CC, TT e LLc. * indica diferença significativa em relação aos machos da mesma linhagem, $p < 0,05$. As barras sobre as colunas indicam o erro padrão da média.



4.2.3 Parâmetros Hematológicos

Os resultados das análises hematológicas em galinhas poedeiras e frangos de corte são mostrados na tabela 5. Os valores de hemácias, de hemoglobina e hematócrito foram maiores em frangos de corte.

Os valores de leucócitos totais, heterófilos, linfócitos, eosinófilos e monócitos foram maiores nos animais de postura. Quanto aos bastonetes e a relação H/L não houve diferença significativa.

Tabela 5 - Média seguida do erro padrão da média dos parâmetros hematológicos em aves de linhagens de postura e aves de corte.

	Postura	Corte
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	2,97* \pm 0,16	4,63 \pm 0,25
Hemoglobina (g/dL)	6,37* \pm 0,35	8,49 \pm 0,37
Hematócrito (%)	29,86* \pm 0,86	38,83 \pm 1,24
Leucócitos totais ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	20960* \pm 2183	4376 \pm 531
Heterófilos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	7764* \pm 738,6	1341 \pm 189,1
Linfócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	9959* \pm 1409	2210 \pm 288
Eosinófilos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	793,3* \pm 212,9	148,1 \pm 3,5
Monócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	2299* \pm 466,5	747,1 \pm 134,5
Relação H/L	1,004 \pm 0,1	0,69 \pm 0,06

*indica diferença significativa, $p < 0,05$.

Nas galinhas poedeiras, os valores de hemácias foram maiores na linhagem CCc que na linhagem CC. Os demais parâmetros foram semelhantes entre as três linhagens estudadas (tabela 6).

Tabela 6 - Média seguida do erro padrão da média dos parâmetros hematológicos de galinhas poedeiras das linhagens MM, CC e CCc.

	MM	CC	CCc
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	2,96 \pm 0,302	2,52* \pm 0,253	3,53 \pm 0,201
Hemoglobina (g/dL)	6,56 \pm 0,505	6,65 \pm 0,635	5,9 \pm 0,625
Hematócrito (%)	30 \pm 1,822	30,8 \pm 1,59	28,7 \pm 1,155
Leucócitos totais ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	23100 \pm 3467	19480 \pm 3779	20878 \pm 4169
Heterófilos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	8085 \pm 1374	6593 \pm 1156	8795 \pm 1349
Linfócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	11171 \pm 2497	9477 \pm 2422	9520 \pm 2584
Eosinófilos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	1164 \pm 403,1	400 \pm 181,8	507,3 \pm 241,3
Monócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	2320 \pm 349,5	1992 \pm 520,3	2620 \pm 1239
Relação H/L	0,844 \pm 0,148	0,956 \pm 0,158	1,186 \pm 0,204

*indica diferença significativa em relação a linhagem CCc, $p < 0,05$.

Em frangos de corte, os monócitos foram encontrados em maior quantidade na linhagem LLc. Não foi encontrada diferença significativa em relação aos outros parâmetros hematológicos (Tabela 7).

Tabela 7 - Média seguida do erro padrão da média dos parâmetros hematológicos frangos de corte das linhagens TT e LLc.

	TT	LLc
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	4,3 \pm 0,385	4,9 \pm 0,337
Hemoglobina (g/dL)	8,5 \pm 0,556	8,45 \pm 0,516
Hematócrito (%)	39,9 \pm 2,0	37,8 \pm 1,516
Leucócitos totais ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	3904 \pm 698	4817 \pm 800
Heterófilos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	1319 \pm 263	13961 \pm 279,6
Linfócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	1820 \pm 312,4	2574 \pm 465,2
Eosinófilos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	186 \pm 48,76	112,8 \pm 50,34
Monócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	555,1* \pm 174,5	926,2 \pm 196,8
Relação H/L	0,799 \pm 0,099	0,601 \pm 0,875

*indica diferença significativa, $p < 0,05$.

Ao comparar machos e fêmeas da mesma linhagem, é possível observar diferença significativa em alguns parâmetros (Tabela 8 e 9). Houve diferença significativa em relação ao sexo na linhagem MM, onde machos apresentaram maiores valores de hemoglobina e hematócrito que as fêmeas da mesma linhagem. Os machos da linhagem CC tiveram maiores valores de hemoglobina e menores valores de heterófilos que as fêmeas. Na linhagem CCc, valores de hematócrito foram maiores nos machos. Na linhagem TT machos apresentaram maiores valores de hemácias, hemoglobina e hematócrito e menores valores de linfócitos. Machos da linhagem TT apresentaram maiores valores de hemoglobina e hematócrito

Tabela 8 - Média seguida do erro padrão da média dos parâmetros hematológicos de fêmeas e machos das linhagens MM, CC e CCc.

	Fêmeas			Machos		
	MM	CC	CCc	MM	CC	CCc
Hemácias	2,66 ±	2,29±	3,47±	3,14±	2,70±	3,58±
(x10 ⁶ /μL)	0,25	0,3	0,25	0,46	0,4	0,33
Hemoglobina	4,97*±	6,00*±	4,48±	7,51±	7,20±	7,32±
(g/dL)	0,330	0,81	0,19	0,27	0,95	0,84
Hematócrito	24*±	27±	26*±	33,6±	34±	31,4±
(%)	1,155	0,316	0,83	0,5	2,17	1,29
Leucócitos	24787±	24728±	27896±	22088±	15107±	13860±
totais (x10 ⁶ /μL)	2065	4442	6835	5630	5549	2621
Heterófilos	10790±	9291*±	10426±	6462±	4345±	7165±
(x10 ⁶ /μL)	2034	1344	1911	1512	1214	1791
Linfócitos	9536±	10516±	13833±	12153±	8611±	5207±
(x10 ⁶ /μL)	641,1	1654	4421	4086	4400	1099
Eosinófilos	834,5±	679,8±	862,4±	1361±	166,8±	152,2±
(x10 ⁶ /μL)	198,2	369,5	437,3	645	78,6	87,55
Monócitos	2666±	2024±	1588±	2112±	1966±	3653±
(x10 ⁶ /μL)	473,9	435	50,6	496	930,7	2472
Relação H/L	1,169±	0,90±	0,98±	0,65±	1,00±	1,4±
	0,28	0,06	0,3	0,11	0,30	0,28

*indica diferença significativa em relação aos machos da mesma linhagem, $p < 0,05$.

Tabela 9 - Média seguida do erro padrão da média dos parâmetros hematológicos de fêmeas e machos das linhagens TT e LLc

	Fêmeas		Machos	
	TT	LLc	TT	LLc
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	3,21*±0,4	5,17±0,19	5,19±0,38	4,70±0,55
Hemoglobina (g/dL)	6,37*±0,41	6,77*±0,38	10,13±0,22	9,57±0,56
Hematócrito (%)	32,5*±1,4	33*±1,0	45,5±1,3	41±1,75
Leucócitos totais (x10 ⁶ /μL)	3642±778,9	5967±905,9	4100±1116	4050±11,58
Heterófilos (x10 ⁶ /μL)	1079±273,8	1818± 438,3	1499±417	1057±345
Linfócitos (x10 ⁶ /μL)	1737* 410,9	3104±647,4	1882±475	2220±646
Eosinófilos (x10 ⁶ /μL)	337,0±71,87	140±100,7	72,75±26,18	94,67±55,33
Monócitos (x10 ⁶ /μL)	486,5±180,1	838,7±208,1	606,6±284	984,6±306
Relação H/L	0,70±0,15	0,74±0,16	0,87±0,13	0,50±0,09

*indica diferença significativa em relação aos machos da mesma linhagem, $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

A avicultura é uma das mais importantes atividades da agroindústria. Nos últimos anos houve um grande aumento de produção na indústria avícola, e o surgimento de técnicas modernas e da seleção genética tem contribuído para esse processo (CHEEMA et al., 2003).

Com aumento na produção de aves e a restrição quanto ao uso de antibióticos como promotores de crescimento, há um maior risco de aparecimento de surto de doenças, o que pode trazer grandes prejuízos. Dessa forma, é importante o desenvolvimento de aves com maior resistência a doenças (SWAGGERTY et al., 2009). Por isso é necessário uma maior compreensão sobre o sistema imune das aves.

A EMBRAPA Suínos e Aves vem desenvolvendo linhagens de galinhas poedeiras e frangos de corte selecionadas para melhor produção. Porém, há poucos estudos sobre o sistema imune destes animais. Neste trabalho foi avaliada a resposta de cinco linhagens de galinhas desenvolvidas pela EMBRAPA. As linhagens de galinhas poedeiras foram a MM, que são animais de postura de ovos castanhos, a CC, que são animais de postura de ovos brancos, e a CCc, uma linhagem controle. Os frangos de corte foram das linhagens TT, selecionada para maior produção, e a LLc desenvolvida sem a seleção genética.

A identificação e a eliminação dos agentes infecciosos é uma das funções do sistema imune (KUGT; KLASING., 2009). A primeira linha de defesa contra patógenos é a imunidade inata (JAYASEKERA et al., 2007; MATSON et al., 2005) que promove uma resposta inicial podendo limitar ou impedir o processo infeccioso (KAISER, 2010). A resposta imune nos estágios iniciais da infecção é um fator crítico para a resistência ou a suscetibilidade a doenças (KUGT; KLASING, 2009).

Os macrófagos e neutrófilos são células da imunidade inata capazes de reconhecer, fagocitar e destruir micro-organismos (QURESHI, 2003). Em aves, as células equivalentes a neutrófilos encontrados em mamíferos são os heterófilos. Essas células fagocitam micro-organismos. Após a fagocitose, o patógeno ingerido é internalizado no fagossomo e destruído (KAISER, 2010).

Segundo Sun e colaboradores (2008), a observação de uma maior capacidade fagocítica de macrófagos de aves pode indicar que fagocitose exerce

uma melhor resposta imune celular e possivelmente está relacionada a uma maior capacidade em processar e apresentar antígenos.

Os dados do presente estudo mostram que a atividade fagocítica de macrófagos foi semelhante entre galinhas poedeiras e frangos de corte. Entre as diversas linhagens de postura (MM, CC e CCc) e as linhagens de corte (TT e LLc) e entre machos e fêmeas da mesma linhagem também não foi encontrada diferença significativa. Alguns autores mostram resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho, onde a porcentagem de células que fagocitaram não difere nas linhagens estudadas. Cheema e colaboradores (2003) observaram que a porcentagem de fagocitose de hemácias de carneiro por macrófagos de frangos de corte da linhagem *Athens Canadian RandomBred Control* (ACRBC) e da linhagem Ross 308 foi semelhante, embora o número de hemácias fagocitadas foi maior na linhagem Ross 308. A linhagem Ross 308 foi selecionada para melhor desempenho de frangos de corte, enquanto na linhagem ACRBC não houve seleção genética e esta é utilizada como controle. Outro estudo também mostra que macrófagos de aves de postura selecionadas para alta produção de anticorpos fagocitaram mais hemácias de carneiro que macrófagos de aves selecionadas para baixa produção de anticorpos, apesar de que a porcentagem de células contendo leveduras não foi diferente entre os dois grupos (GUIMARÃES et al., 2011). Outros autores, ao avaliar a porcentagem de células que fagocitaram hemácias de aves, não encontraram diferença entre as linhagens Silkie Bantam e Starbro, porém a porcentagem de hemácias fagocitadas foi maior na linhagem Silky (SUN et al., 2008).

Macrófagos obtidos de galinhas poedeiras selecionadas para alta produção de IgM (HIM) e alta produção de IgG (HIG) apresentaram uma maior fagocitose do que os macrófagos de linhagens selecionadas para baixa produção de IgM (LIM) e baixa produção de IgG (LIG) (SARKER et al., 2000). Kreukniet e colaboradores (1994), ao estudar aves selecionadas para altos ou baixos títulos de anticorpos contra hemácia de carneiro, observaram que não havia diferença na atividade fagocítica de granulócitos *in vivo*. Porém, *in vitro*, a ingestão de leveduras foi maior na linhagem selecionada para altos títulos de anticorpos. Chuammitri et al (2011) avaliaram a resposta imune inata de três linhagens de galinhas. Foi estudada a linhagem Fayoumi (nativa do Egito), uma linhagem de frango de corte e a linhagem Leghorn de postura, e foi verificado que heterófilos das linhagens estudadas respondem diferentemente após a estimulação *in vitro*. Heterófilos das

galinhas poedeiras apresentaram menor atividade fagocítica que as linhagens Fayoumi e de frango de corte (CHUAMMITRI et al., 2011). Estes resultados mostram diferenças na atividade de fagócitos das linhagens estudadas, o que não foi observado neste trabalho.

O principal mecanismo que leva à destruição do micro-organismo por macrófagos após a fagocitose é a produção de NO (MACMICKING et al., 1997). Neste trabalho foi demonstrado que a produção de NO foi maior em frangos de corte que em galinhas poedeiras, o que difere dos resultados encontrados por Pamentier et al (2010), onde foi avaliada a produção de NO em leucócitos de galinhas poedeiras (Lohmann Brown) e de frangos de corte (Ross) durante 21 dias após o desafio com LPS ou albumina humana (HuSA). Durante todo o período observado não foi encontrada diferença, porém, as galinhas poedeiras produziram mais NO que frangos de corte no 14º dia após o desafio.

O sexo não influenciou a produção de NO e entre as linhagens de galinhas poedeiras e entre as linhagens de frangos de corte também não foi encontrada diferença significativa, concordando com os resultados de Cheema e colaboradores (2003) que não encontraram diferença na produção de NO entre frangos de corte da linhagem ACRBC e Ross 308. No entanto, o trabalho realizado por Guimarães et al (2011) mostra que macrófagos ativados obtidos de galinhas selecionadas para alta produção de anticorpos apresentam uma maior produção de NO que macrófagos de aves selecionadas para baixa produção de anticorpos.

Quanto a atividade antibacteriana dos macrófagos de galinhas poedeiras e frangos de corte não foi encontrada diferença significativa neste estudo. Entre as linhagens de postura e de corte, e entre machos e fêmeas a atividade antibacteriana de macrófagos também foi semelhante. Diferentemente dos dados aqui observados, Chuammitri et al (2011) mostraram que a capacidade microbicida foi maior em heterófilos de galinhas Leghorn e de frangos de corte que de galinhas da linhagem Fayoumi (CHUAMMITRI et al., 2011). Os heterófilos são células equivalentes aos neutrófilos e assim como os macrófagos desempenham importantes função na resposta imune inata (KAISER, 2010).

A medida do halo de inibição do crescimento bacteriano foi utilizada para avaliar a atividade antibacteriana do soro. O protocolo para a realização do experimento foi utilizando 10 animais de cada linhagem, sendo 5 fêmeas e 5 machos. Este número reduzido de animais provavelmente impediu que fosse

encontrada diferença significativa. Porém, pode ser observado que nas aves de postura há maior atividade antibacteriana que em frangos de corte.

Um dos mecanismos de virulência de bactérias é a resistência sérica, que pode desempenhar importante papel na patogênese de doenças aviárias, visto que bactérias sensíveis ao soro são incapazes de infectar órgãos internos (MELLATA et al., 2003). A resistência sérica pode ser resultado do bloqueio, má formação ou a não formação, do complexo de ataque à membrana, que atua causando a lise da célula-alvo, principal função do sistema complemento (BINNS et al., 1982).

No experimento de resistência sérica foi observado que, após 30 minutos de incubação, aves de postura apresentaram uma melhor resposta que aves de corte. E, embora não houve diferença significativa, os animais de postura continuaram respondendo melhor até 120 minutos de incubação. Este resultado pode indicar que as aves de postura desenvolvem melhor alguns mecanismos da imunidade inata que aves de corte, uma vez que a resistência sérica pode ser resultado de uma falha na atividade do sistema complemento (BINNS et al., 1982). Entre os animais de postura, a linhagem MM respondeu melhor que as linhagens CC e CCc, com 30 minutos de incubação. Nos demais períodos não houve diferença significativa. E entre as linhagens de corte, TT e LLc, também não foi encontrada diferença em nenhum momento.

Quanto ao sexo, foi observado no início do experimento de resistência sérica que os machos das linhagens MM, CC e CCc, que são aves de postura, responderam melhor que as fêmeas das mesmas linhagens. Porém, ao final do experimento as fêmeas das linhagens MM e CC apresentaram uma melhor resposta que os machos. E os machos das linhagens de corte TT e LLc, responderam melhor que as fêmeas até 120 minutos de incubação, com 150 e 180 minutos a resposta foi semelhante entre machos e fêmeas destas linhagens. Portanto, em aves o sexo pode influenciar a atividade do sistema complemento, como pode ser visto pelo resultado da resistência sérica.

Frangos de corte são desenvolvidos para rápido crescimento e, devido ao curto período de vida destes animais, é importante uma resposta imune inata eficaz, pois ela é rapidamente ativada podendo impedir um processo infeccioso, enquanto a resposta imune adaptativa pode demorar semanas para ocorrer. Os resultados aqui obtidos mostram que a atividade fagocítica e

antibacteriana de macrófagos e atividade antibacteriana do soro foram semelhantes entre frangos de corte e galinhas poedeiras. Em relação à atividade do sistema complemento, avaliada através do teste de resistência sérica, galinhas poedeiras responderam melhor. Entretanto, a produção de NO foi maior em frangos de corte, o que poderia indicar que os macrófagos destes animais apresentam uma maior capacidade em destruir micro-organismos fagocitados. Contudo, não podemos fazer essa afirmação, pois a atividade antibacteriana de macrófagos foi semelhante entre frangos de corte e galinhas poedeiras.

O baço é o órgão responsável pela resposta contra antígenos presentes na circulação sanguínea (ROITT, 1999), desta forma alterações no tamanho desse órgão pode comprometer a resposta imunológica. Neste trabalho foi observado que o peso relativo do baço de galinhas poedeiras é maior que de frangos de corte. Dentre os animais de postura, aves da linhagem MM tiveram o peso relativo do baço maior que animais da linhagem CC, e entre as linhagens TT e LLc (corte) não houve diferença significativa. Frangos da linhagem ACRBC, mesmo tendo ganho de peso menor, apresentaram os pesos relativos do baço, da bursa e das tonsilas cecais significativamente maiores que das aves da linhagem Ross 308, indicando que seleção genética para maior de peso, pode levar à redução do peso relativo dos órgãos linfoides primários e secundário (CHEEMA et al., 2003). Embora os pesos relativos do baço de aves de postura foram maiores que de aves de corte, e entre as linhagens de postura também houve diferença, os resultados obtidos neste estudo não conferem com os obtidos por Cheema e colaboradores (2003), pois entre as linhagens de corte os pesos relativos do baço foram semelhantes. Os resultados aqui obtidos ainda mostram que o sexo influencia o peso do baço, onde foi observado que na linhagem CC as fêmeas tiveram o peso relativo maior que os machos, enquanto na linhagem TT, as fêmeas apresentaram o peso menor.

Os títulos de anticorpos no sangue é uma das formas de avaliar a competência imunológica em animais (BISCARINI et al., 2009). No presente estudo, foi avaliada a produção de anticorpos anti-hemácia de carneiro e anticorpos naturais anti-hemácia de coelho.

Os dados mostram que galinhas poedeiras produzem mais anticorpos anti-hemácia de carneiro que frangos de corte, o que sugere que a linhagem de postura possui uma resposta imune humoral mais eficaz que a linhagem de corte. Em galinhas poedeiras, a linhagem MM (aves de postura de ovos

castanhos) é a que teve menores títulos de anticorpos. Em frangos de corte não houve diferença significativa entre as linhagens. Quanto ao sexo, também foi observado que fêmeas produzem mais anticorpos que machos da mesma linhagem. Estes resultados mostram que a seleção genética para determinadas características e o sexo podem influenciar a imunidade adaptativa em aves.

Tem sido sugerido que a seleção genética para promover um maior desempenho, em frangos de corte ou galinhas poedeiras, tem impacto negativo na resposta imune humoral. Aves da linhagem Ross 308, selecionadas para melhor performance, tiveram uma maior produção de anticorpos totais, IgM e IgG contra hemácia de carneiro que os animais ACRBC (CHEEMA et al., 2003). Embora no presente estudo foi encontrada diferença na produção de anticorpos entre as linhagens de postura e de corte, e entre as linhagens de galinhas poedeiras, os títulos de anticorpos em frangos de corte selecionados para melhor produção (TT) foram semelhante aos encontrados em frangos de corte não selecionados (LLc).

Deif e colaboradores (2007) também observaram diferenças na produção de anticorpos entre linhagens de frangos de corte, o que não foi observado neste estudo. Frangos de corte da linhagem Hubbard, tanto após a primeira como após a segunda imunização com hemácia de carneiro, tiveram títulos de anticorpos significativamente mais altos que frangos da linhagem Cobb. Esse resultado pode indicar que a linhagem Hubbard tem uma melhor memória imunológica e maior resistência a doenças que a linhagem Cobb (DEIF et al., 2007).

Maiores títulos de anticorpos encontrados em galinhas poedeiras que em frangos de corte estão de acordo com outros estudos. Koenen et al (2002) investigaram diferenças na resposta imune entre frangos de corte (Ross) e galinhas poedeiras (White Leghorn) imunizadas com trinitrophenyl conjugado com KLH (TNP-KLH). A produção de IgM anti-TNP foi semelhantes em ambas as linhagens. Porém frangos de corte tiveram menores níveis de IgG anti-TNP. Segundo os autores essas diferenças podem ser causadas por variações na estrutura e função dos órgãos linfoides, devido à seleção genética. Porém Parmentier et al (2010) encontraram níveis significativamente maiores de anticorpos totais, IgM e IgG para albumina humana (HuSA) em frangos de corte (Ross) que em galinhas poedeiras (Lohmann Brown), diferentemente dos resultados aqui obtidos.

A observação de que aves da linhagem MM (postura) apresentaram menores títulos de anticorpos que as demais linhagem de postura estão de acordo

com Cheng et al (2001), que também encontraram diferença entre linhagens de galinhas poedeiras. A fim de avaliar o efeito da seleção genética para alta produção e sobrevivência, os autores estudaram a resposta imune em aves selecionadas para alta produção e sobrevivência (HGPS) e aves selecionadas para baixa produção e sobrevivência (LGPS). Estes autores demonstraram que aves LGPS tiveram uma maior produção de IgG que as aves HGPS. Além disso, a porcentagem de células T CD8⁺ em aves HGPS foi significativamente menor em comparação com as aves LGPS. Estes resultados sugerem que a seleção para alta produção e sobrevivência altera o sistema imune das aves. (CHENG et al., 2001).

Aves selecionadas para alta produção de IgM (HIM) e alta produção de IgG (HIG) apresentaram títulos de anticorpos contra *Brucella abortus* significativamente maiores que aves selecionadas para baixa produção de IgM (LIM) e baixa produção de IgG (LIG), sugerindo que toda a multiplicação e diferenciação de células B dos animais das linhagens HIM e HIG podem ser mais eficientes que das linhagens LIM e LIG (SARKER et al., 2000).

Anticorpos naturais fazem parte da imunidade inata e são produzidos constitutivamente (WIJGA et al., 2009). Eles podem ter um papel importante na iniciação e na regulação da resposta imune específica em aves (LAMMERS et al., 2004). Os níveis de anticorpos naturais presentes em amostras de sangue podem fornecer importantes informações sobre a imunocompetência do animal (MATSON et al., 2005). Altos níveis de anticorpos naturais contra hemácias de coelho estão presentes em aves porque essas células expressam altos níveis do epítipo α - Gal (COTTER et al., 2005).

O epítipo α -Gal é um carboidrato produzido naturalmente em mamíferos não-primatas (GALILI, 2005). Esses epítipos são encontrados em micro-organismos presentes ao longo do trato gastrointestinal, que por sua vez estimulam as células B a produzirem anticorpos anti-Gal. (GALILI, 2005; PARMENTIER et al., 2008).

A determinação dos títulos de anticorpos naturais foi realizada através do teste de hemaglutinação com hemácia de coelho utilizando amostras do dia 0 e do 37º dia após a imunização com hemácia de carneiro. Galinhas poedeiras apresentaram maiores títulos de anticorpos naturais contra hemácia de coelho que frangos de corte, tanto no momento pré-imune quanto após o desafio com hemácia de carneiro. Os títulos de anticorpos anti-hemácia de coelho foram semelhantes

entre as linhagens de galinhas poedeiras, porém em frangos de corte foi observado que antes do desafio na linhagem TT houve maiores níveis de anticorpos que na linhagem LLc. Em relação ao sexo, fêmeas das linhagens CC e LLc produziram mais anticorpos que machos da mesma linhagem.

Foram determinados também os títulos de anticorpos contra hemácia de carneiro com amostras pré-imune (dia 0), esses anticorpos também são naturais uma vez que estavam presentes antes da imunização. Os títulos de anticorpos naturais contra hemácia de carneiro foram maiores em galinhas poedeiras que em frangos de corte. Entre as linhagens de postura, a MM apresentou menores níveis de anticorpos que as linhagens CC e CCc, enquanto nas aves de corte não houve diferença. E fêmeas da linhagem LLc tiveram maiores níveis de anticorpos que os machos da mesma linhagem.

Os resultados dos títulos de anticorpos naturais neste estudo podem mostrar que aves de posturas são capazes de induzir uma melhor resposta imune inata, uma vez que a produção desses anticorpos é um importante mecanismo da imunidade inata (WIJGA et al., 2009).

Wijga et al (2009) encontraram uma correlação positiva entre os títulos de anticorpos específicos contra hemácias de carneiro e os níveis de anticorpos naturais contra hemácias de coelho em galinhas. Este resultado mostra a possibilidade de melhorar os níveis da imunidade inata das aves através da seleção de melhores respostas adaptativas na forma da produção de altos níveis de anticorpos específicos contra hemácias de carneiro.

Anticorpos naturais contra hemácias de coelho foram encontrados em galinhas selecionadas para alta produção de anticorpos responsivos contra hemácias de carneiro em comparação com aves não selecionadas ou aves selecionadas para baixa produção de anticorpos, durante gerações subseqüentes. Esse resultado mostra uma relação genética entre anticorpos naturais contra hemácias de coelho e anticorpos específicos contra hemácias de carneiro (COTTER et al., 2005).

Quanto aos parâmetros hematológicos, neste trabalho foi observado que as aves de postura possuem menores valores de hemácias, hemoglobina e hematócrito e maiores valores de leucócitos totais, heterofilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos que aves de corte. Entre as linhagens de postura, a linhagem CCc apresentou maior valor de hemácias que a linhagem CC, e em frangos de corte a

linhagem LLc teve maior número de monócitos. Quanto ao sexo, fêmeas e machos da mesma linhagem apresentaram diferenças em alguns parâmetros hematológicos. Os valores de bastonetes e a relação heterófilo/linfócito foram semelhantes em todas as linhagens. Estes resultados coincidem com os obtidos por Cheng et al (2001), que também encontraram diferenças em alguns parâmetros hematológicos entre as linhagens estudadas. Os autores observaram que aves HGPS apresentaram maior porcentagem de linfócitos e uma porcentagem menor de heterofilos, o que levou a menor relação H/L, que as aves LGPS. Segundo os autores, um maior número de heterofilos e uma menor relação H/L podem sugerir uma maior capacidade de adaptação ao estresse. Ainda, os animais da linhagem LGPS apresentaram maiores valores de eosinófilos, enquanto os valores de monócitos e basófilos não tiveram diferenças significativa. Os heterófilos, os monócitos e eosinófilos desempenham importante papel na imunidade inata, enquanto os linfócitos são importantes células da imunidade adaptativa. Desta forma, um número reduzido dessas células pode comprometer a defesa do hospedeiro contra infecções.

6 CONCLUSÃO

Enquanto produção de óxido nítrico por macrófagos foi maior em frangos de corte, a atividade do sistema complemento foi maior em aves de postura. Contudo, os resultados da atividade fagocítica e antibacteriana de macrófagos e a atividade antibacteriana do soro em ágar foram semelhantes nas linhagens estudadas.

A seleção genética também pode ter influenciado o peso relativo do baço, onde galinhas poedeiras tiveram o peso maior que frangos de corte e entre as linhagens postura, animais da linhagem MM apresentaram um maior peso do baço que animais da linhagem CC.

Quanto à resposta imune humoral os resultados dos títulos de anticorpos naturais e específicos mostram que aves de postura produzem mais anticorpos que os animais de corte. Além disso, entre os animais de postura, as linhagens CC e CCc produziram mais anticorpos que a linhagem MM.

Os parâmetros hematológicos também foram diferentes entre as linhagens. Aves de postura tiveram menores valores de hemácias, hemoglobina e hematócrito e um maior número de leucócitos que frangos de corte.

De acordo com os resultados obtidos sugere-se que a seleção genética pode afetar a resposta imunológica em aves, onde animais de postura apresentam maior produção de anticorpos, e maior atividade do sistema complemento que frangos de corte. Embora a produção de NO tenha sido menor nas aves de postura, esses dados podem indicar que estes animais tenham uma maior capacidade em desenvolver uma resposta imune adequada protegendo o animal contra infecções.

A identificação de características genéticas favoráveis pode contribuir para o melhor entendimento da resposta imune em aves. Além disso pode colaborar com o desenvolvimento de novas linhagens de aves mais resistentes a patógenos.

REFERÊNCIAS

- BABA, K. ; MASUMOTO, S.; NISHIDA, S.; KAJIKAWA, T. Harderian gland dependency of immunoglobulin. A production in the lachrymal fluid of chicken. **Immunology**. v. 65, p. 67-71, 1988.
- BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole. 1992.
- BARTL, S.; BAISH, M.; WEISSMAN, I.L.; DIAZ, M. Did the Molecules of Adaptive Immunity Evolve from the Innate Immune System? **Integr. Comp. Biol.**, v. 43, p. 338–346, 2003.
- BAUMGARTH, N.; HERMAN, O. C.; JACER, G. C.; BROWN, L., HERZENBERG, L.A., HERZENBERG, L. A. Innate and acquired humoral immunities to influenza virus are mediated by distinct arms of the immune system. **Proc.Natl.Acad.Sci. USA**, v.96, p. 2250-2255, 1999.
- BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Nobel, 1970.
- BECKMAN, J.; KOPPENOL, W. Nitric oxide, superoxide, and peroxyxynitrite: The good, the bad, and the ugly. **Am. J. Physiol.**, v. 271, p. C1424-C1437, 1996.
- BEFUS, A. D; JOHNSON, N; LESLIE, G. A; BIENENSTOCK, J. gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I Morphology, ontogeny, and some functional characteristics of Peyers patches. **J. of Immunol.**, v. 125, p. 2626, 1980.
- BERCZI, I.; CHOW, D. A.; SABBADINI, E. R. Neuroimmunoregulation and natural immunity. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 15, n. 5, p. 273 – 281, 1998.
- BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Mol. Immunol.**, v. 40, p. 845-859, 2004.
- BINNS, M. M.; MAYDEN, J.; LEVINE, R. P. Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes traT of R100 and iss of ColV,I-K94. **Infect. Immun.**, v. 35, n. 1, p. 654-659, 1982.
- BISCARINI, F.; BOVENHUIS, H.; VAN ARENDONK, J. A. M.; PARMENTIER, H. K.; JUNGERIUS, A. P.; VAN DER POEL, J. J. Across-line SNP association study of innate and adaptive immune response in laying hens. **Anim. Genet.**, v. 41, p. 26-38, 2009.
- BOES, M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. **Mol. Immunol.**, v. 37, p. 1141–1149, 2000.
- BORGHESI, L.; MILCAREK, C. Innate versus adaptive immunity: a paradigm past its prime?. **Cancer Res.**, v. 67, n. 9, p. 3989-3993, 2007.
- BURNS, R. B; MAXWELL, M. H. Ultrastructural of Peyer patches in the domestic fowl and turkey. **J. Anat.**, v. 147, p. 233-241, 1985.

CARDOSO, Ana Lúcia Sicchirolli Paschoal. **Influência de níveis de zinco e vitamina E, isolados e associados, sobre o desempenho e a resposta imunológica humoral em frangos de corte.** 2004. 88f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2004.

CARLANDER, D. **Avian IgY Antibody *in vitro* and *in vivo*** Acta Universitatis Upsaliensis. 2002. 53f. Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy (Faculty of Medicine) in Clinical Chemistry, Uppsala, Uppsala University, 2002.

CARVALHO, B. T. C.; NUDELMAN, V.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Mecanismos de defesa contra infecções. **J. Pediatr.**, v. 74, Supl. 1, p. S3-S11, 1998.

CASTANON, J. I. R. History of the use of antibiotic as growth promoters in european poultry feeds. **Poult. Sci.**, v. 86, p. 2466-2471, 2007.

CHACANA, P. A. TERZOLO, H. R. **Una introducción a la tecnología IgY, anticuerpos de yema de huevo.** 2003. Disponível em: <<http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/ganaderia/otras/aves/igy.htm>>. Acesso em: 01 setembro 2011.

CHACANA, P. A; TERZOLO H. R.; GUTIÉRREZ C. E.; SCHADE R. Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. **Rev. Med. Vet.**, v. 85, n. 5, p. 179-189, 2004.

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

CHENG, H. W.; EICHER, S. D.; CHEN, Y.; SINGLETON, P.; MUIR, W. M. effect of genetic selection for group productivity and longevity on immunological and hematological parameters of chickens. **Poult. Sci.**, v. 80, p. 1079-1086, 2001.

CHUAMMITRI, P.; REDMOND, S.B.; KIMURA, K.; ANDREASEN, C. B.; LAMONT, S. J.; PALIC, D. Heterophil functional responses to dietary immunomodulators vary in genetically distinct chicken lines. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 142, p. 219-227, 2011.

CIRIACO, E; PÍNERA, P; DIAZ-ESNAL, B; LAURA, R. Age-related changes in the avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of fabricius). **Microsc. Res.Tech.**, v. 62, p.482-487, 2003.

COTTER, P.F.; AYOUB, J., PARMENTIER, H. K. Directional selection for specific sheep cell antibody responses affects natural rabbit agglutinins of chickens. **Poult.Sci.**, v. 84, p.220-225, 2005.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA JUNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema Imunitário – parte I: fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e

celulares da resposta inflamatória. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

DEIF, E. A.; GALAL, A.; FATHI, M. M.; ZEIN EL-DEIN. Immunocompetence of two broiler strains fed marginal and high protein diets. **Int. J. Poult. Sci.**, v. 6, n. 12, p. 901-911, 2007.

DEL CACHO, E.; GALLEGO, M.; LÓPEZ-BERNARD, F.; SÁNCHEZ-ACEDO, C.; LILLEHOJ, H.S. Isolation of chicken follicular dendritic cells. **J. Immunol. Methods.**, 2008.

DU CLOS, T. W.; MOLD, C.; Pentraxins (CRP, SAP) in the process of complement activation and clearance of apoptotic bodies through Fcγ receptors. **Curr. Opin. Organ. Transplant.**, v. 16, n. 1, p.15-20, 2011.

ELAZAB, M. F. A.; FUKUSHIMA, Y.; HORIUCHI, H.; MATSUDA, H., FURUSAWA, S. Prolonged suppression of chick humoral immune response by antigen specific maternal antibody. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 71, n. 4, p. 417-424, 2009.

ERF, G. F. Cell-mediated immunity in poultry. **Poult. Sci.**, v. 83, p.580-590, 2004.

FIGUEIREDO, E. A. P.; SCHMIDT, G. S.; LEDUR, M. C.; AVILA, V. S.; BRUM, P. A. R.; FIORENTIN, L.; JAENISCH F. R. F. Genetic gain in egg production and egg weight in White Leghorn Embrapa 011. In: IX World Conference on Animal Production, XVIII Reunião da Assoc. Latinoamericana de Produção Animal, 2003, Porto Alegre, RS, Brasil. **IX World Conference on Animal Production**. Porto Alegre, RS.: WAAP, ALPA, SBZ e UFRGS, 2003a.

FIGUEIREDO, E. A. P.; ROSA, P. S.; SCHEUERMANN, G. N.; JAENISCH, F. R. F.; SCHMIDT, G. S.; LEDUR, M. C.; BRENTANO, L.; COSTA, C. A. F. Genetic gain in body weight, feed conversion and carcass traits in White Plymouth Rock broiler strains. In: IX World Conference on Animal Production, XVIII Reunião da Assoc. Latinoamericana de Produção Animal., 2003, Porto Alegre, RS, Brasil. **IX World Conference on Animal Production**. Porto Alegre, RS.: WAAP, ALPA, SBZ e UFRGS, 2003b.

GALILI, U. The -gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy. **Immunol. Cell Biol.**, v. 83, p. 674 – 686, 2005.

GENNARO, R.; ZANETTI, M. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. **Biopolymers**, v. 55, 31–49, 2000.

GENESER, F. **Histologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

GETZ, G. S. Bridging the innate and adaptive immune systems. **J. Lipid. Res.**, v. 46, p. 619-622, 2005.

GLICK, B. **Immunophysiology**. In: STURKIE, P. D. (Ed.) Avian Physiology. New York: Springer-Verlag, p. 87-101, 1986.

GUIMARÃES, M. C. C.; GUILLERMO, L. V. C.; MATTA.; M. F. R.; SOARES, S. G.; DAMATTA, R. A. Macrophages from chickens selected for high antibody response produced more nitric oxide and have greater phagocytic capacity. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 140, p. 317-322, 2011.

HANGALAPURA, B. N.; NIEUWLAND, M. G. B.; DE VRIES REILINGH, G.; HEEPTKAMP, M. J. W.; VAN DEN BRAND, H.; KEMP, B.; PARMENTIER, H. K. Effects of cold stress on immune responses and body weight of chicken lines divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells. **Poult. Sci.**, v. 82, p. 1692-1700, 2003.

HEMMINGSSON, E. J; LINNA, T. J. Ontogenetic studies on lymphoid cell traffic in the chickens. II. Cell traffic from the bursa of Fabricius to the thymus and spleen in the embryo. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v.42, p. 764-774, 1972.

HENRIQUE, A. Alimentos Funcionais - Parte 2. **Rev. Oxidol.**, v.2, p. 8-12, 2002.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. **Sci.**, v. 327, p. 291-295, 2010.

JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986.

JAYASEKERA, J. P.; MOSEMAN, E. A.; CARROLL, M. C. Natural antibody and complement mediate neutralization of influenza virus in the absence of prior immunity. **J. Virol.**, v. 81, n. 7, p. 3487–3494, abr. 2007.

JEURISSEN, S, H.; BOONSTRA-BLOM, A. G.; AL-GARIB, S. O.; HARTOG, L.; KOCH, G. Defence mechanisms against viral infection in poultry: a review. **Vet. Quart.** v. 22, p. 204-2008, 2000.

JEURISSEN, E; CLAASSEN, E; JANSE, E.M. Histological and fuctional differentiation of non-lymphoid cells in the chicken spleen. **Immunol.**, v. 77, p.75-80, 1992.

JEURISSEN, S. H.; JANSE, E. M. Distribution and function of non-lymphoid cells in liver and spleen of embryonic and adult chickens. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v. 307, p. 149-157, 1989.

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

KLASING, K. C. Avian macrophages: regulators of local and systemic immune responses. **Poult. Sci.**, v. 77, p. 983-989, 1998.

KLOTMAN, M. E.; CHANG, T. A. Defensins in innate antiviral immunity. **Nat. Rev. Immuno.**, v6. n. 6, p. 447-456, 2006.

KOENEN, M. E.; BOONSTRA-BLOM, A. G., JEURISSEN, S. H. M. Immunological differences between layer- and broiler-type chickens. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 89, p. 47- 56, 2002.

KOGUT, M. H.; KLASING, K. An immunologist's perspective on nutrition, immunity, and infectious diseases: Introduction and overview. **J. Appl. Poult. Res.**, v.18, p. 103-110, 2009.

KOHONEN, P.; NERA, K.-P.; LASSILA, O. Avian model for B-cell immunology – new genomes and phylotranscriptomics. **Scand. J. Immunol.**, v. 66, p.113–121, 2007.

KREUKNIET, M. B.; NIEUWLAND, G. B.; VAN DER ZIJPPB, A. J. Phagocytic activity of two lines of chickens divergently selected for antibody production. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 44, p. 371-387, 1994.

LAMMERS, A.; KLOMP, M. E. V.; NIEUWLAND, M. G. B.; SAVELKOUL, H. F. J.; PARMENTIER, H. K. Adoptive transfer of natural antibodies to non-immunized chickens affects subsequent antigen-specific humoral and cellular immune responses. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 28, p.51-60, 2004.

LONG, E. O.; KIM, H. S.; LIU, D., PETERSON, M. E.; RAJAGOPALAN, S. Cell responses: Integration of signals for activation and inhibition. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 31, p. 227-258, 2013.

MACMICKING, J.; XIE, O.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 15, p. 323-350, 1997.

MAGARI, M.; KANEHIRO, Y.; TODO, K.; IKEDA, M.; KANAYAMA, N.; OHMORI, H. Enhancement of hypermutation frequency in the chicken B cell line DT40 for efficient diversification of the antibody repertoire. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 396, n. 2, p. 353-358, 2010.

MAGARI, M.; AYA, T.; IKEDA, M.; TODO, K.; KANAYAMA, N.; OHMORI, H. Enhancement of antibody production from a chicken B cell line DT40 by reducing Pax5 expression. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 107, n. 2, p. 206-209, 2009.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 17, p. 12231-12234, 1993.

MATSON, K. D.; RICKLEFS, R. E.; KLASING, K. C. A hemolysis–hemagglutination assay for characterizing constitutive innate humoral immunity in wild and domestic birds. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 29, p. 275-286, 2005.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Innate immunity. **N. Engl. J. Med.**, v. 343, n. 5, p. 338-344, 2000.

MELLATA, M.; DHO-MOULIN, M.; DOZOIS, C. M.; CURTISS, R.; BROWN, P. K.; AME, P.; BRÉE, A.; DESAUTELS, C.; FAIRBROTHER, J. M. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *escherichia coli* to serum and in pathogenicity. **Infect. Immun.**, v. 71, n.1, p. 536-540, 2003.

- MINOZZI, G.; PARMENTIER, H. K.; MIGNON-GRASTEAU, S.; NIEUWLAND, M. G. B.; BED'HOM, B.; GOURICHON, D.; MINVIELLE, F.; PINARD-VAN DER LANN, M. H. Correlated effects of selection for immunity in White Leghorn chicken lines on natural antibodies and specific antibody responses to KLH and *M. butyricum*. **BMC Genet.**, v. 9, n. 5, p. 1-13, 2008.
- MOHAMMED, S. M.; MORRISON, S.; WIMS, L.; TRINH, K. R.; WILDEMAN, A. G.; BONSELAAR J.; ETCHES, R. J. Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. **Immunotechnology**, v. 4, p. 115-125, 1998.
- MORGULIS, M. S. *Imunologia Aplicada*. In: MACARI, M; FURLAN, R.L; GONZALES, E. **Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte**. Jaboticabal: FUNEP, p. 231-245, 2002.
- MORRISON, S. L.; MOHAMMED, S. M.; WIMS, L. A.; TRINH, R.; ETCHES, R. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. **Mol. Immunol.**, v.38, p. 619-625, 2001.
- OPPENHEIN, J. J.; BIRAGYN, A.; KWASK, L. W.; YANG, D. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 62 (Supl. II), p. ii17- ii21, 2003.
- PARMENTIER, H. K.; DE VRIES REILINGH, G.; FREKE, P.; KOOPMANSCHAP, R. E.; LAMMERS, A. Immunological and physiological differences between layer- and broiler chickens after concurrent intratracheal administration of lipopolysaccharide and human serum albumin. **Int. J. Poult. Sci.**, v. 9, n. 6, p. 574 – 583, 2010.
- PARMENTIER, H. K.; DE VRIES REILINGH G.; LAMMERS A. Decreased specific antibody responses to α -Gal-conjugated antigen in animals with preexisting high levels of natural antibodies binding α -Gal residues. **Poult. Sci.**, v.87, p 918-926, 2008.
- PARMENTIER, H. K.; LAMMERS, A.; HOEKMAN, J.; DE VRIES REILINGH, G.; ZAAANEN, I. T. A.; SAVELKOUL, H. F. J. Different levels of natural antibodies in chickens divergently selected for specific antibody responses. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 28, p. 39-49, 2004.
- PELKONEN S, FINNE J. A rapid turbidimetric assay for the study of serum sensitivity of *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 42, p. 53-57, 1987.
- PIKE, K.A.; BAIG, E.; RATCLIFFE, M.J.H. The avian B-cell receptor complex: distinct roles of Iga and Igb in B-cell development. **Immunol. Rev.**, 197:10–25, 2004a.
- PIKE, K.A.; IACAMPO, S.; FRIEDMANN, J.E.; RATCLIFFE, M.J.H. The cytoplasmic domain of Iga is necessary and sufficient to support efficient early B cell development. **J. Immunol.**, v. 172, n. 4, p. 2210 - 2218, 2004b.
- QURESHI, M. A. Avian macrophage and immune response: an overview. **Poult. Sci.**, v. 82, p. 691-698, 2003.

ROITT, I; BROSTOFF, J; MALE, D. **Imunologia**. 5. ed. São Paulo: Manole, 1999.

ROSNET, O.; BLANCO-BETANCOURT, C.; GRIVEL, K.; RICHTER, K.; SCHIFF, C. Binding of free immunoglobulin light chains to vpreb3 inhibits their maturation and secretion in chicken b cells. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 10228–10236, 2004.

SHAMRI, R., XENAKIS, J., SPENCER, L. S. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. **Cell Tissue Res.**, v. 343, n.1, p. 57-83, 2011.

SARKER, N.; TSUDZUKI, M.; NISHIBORI, M.; YASUE, H.; YAMAMOTO, Y. cell-mediated and humoral immunity and phagocytic ability in chicken lines divergently selected for serum immunoglobulin m and g levels. **Poult. Sci.**, v. 79, p. 1705 – 1709, 2000.

SAYEGH, C.E.; RAO, M.A.; RATCLIFFE, M.J.H. Avian B cell development: lessons from transgenic models. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 7, p. 31- 37, 1999.

SCOTT, T. R. Our current understanding of humoral immunity of poultry. **Poult. Sci.**, v. 83, p. 574–579, 2004.

SIJBEN, J. W. C; NIEWLAND, M. G.; KEMP, B.; PARMENTIER, H. K.; SCHRAMA, J. W. Interactions and antigen dependence of dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on antibody responsiveness in growing layer hens. **Poult. Sci.**, v, 80, p. 885-893, 2001.

SIJBEN, J. W. C; DE GROOT, H.; NIEWLAND, M. G. ; SCHRAMA, J. W.; PARMENTIER, H. K. Dietary linoleic acid divergently affects immune responsiveness of growing layer hens. **Poult. Sci.**, v. 79, p. 1106-1115, 2000a.

SIJBEN, J. W. C.; SCHRAMA, J. W.; NIEUWLAND, M. G. B.; PARMENTIER, H. K. Immunomodulatory effects of indomethacin and prostaglandin e2 on primary and secondary antibody response in growing layer hens. **Poult. Sci.**, v. 79, p. 949-955, 2000b.

STAR, L.; FRANKENA, K.; KEMP, B.; NIEUWLAND, M. G. B.; PARMENTIER. Natural humoral immune competence and survival in layers. **Poult. Sci.**, v.86, p.1090-1099, 2007.

SWAGGERTY, C. L.; PEVZNER, I. Y.; HE, H.; GENOVESE, K. J.; NISBET, D. J.; KAISER, P.; KOGUT, M. H. Selection of broilers with improved innate immune responsiveness to reduce on-farm infection by foodborne pathogens. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 6, n. 7, p. 777-783, 2009.

SUN, S. F.; PAN, Q. Z.; HUI, X.; ZHANG, B. L.; WU, H. M.; LI, H.; XU, W.; ZHANG, Q.; LI, J. Y.; DENG, X. M.; CHEN, J. W.; LIAN, Z. X.; LI, N. Stronger in vitro phagocytosis by monocytes-macrophages is indicative of greater pathogen clearance and antibody levels in vivo. **Poult. Sci.**, v. 87, p. 1725 -1733, 2008.

TEGLA, C. A.; CUDRICI, C.; PATEL, S.; TRIPPE, R.; RUS, V.; NICULESCU, F.; RUS, H. Membrane attack by complement: the assembly and biology of terminal complement complexes. **Immunol. Res.**, v. 51, n.1, 2011.

TEMPERLEY, N. D.; BERLIN, S.; PATON, I. R.; GRIFFIN.; BURT, D. W. Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family: a story of gene gain and gene loss. **BMC Genomics**, v. 9, n.62, 2008.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. 5. ed. São Paulo: Roca, 1998.

TOLEDO, G. S. P.; COSTA, P. T. C., SILVA, L. P., PINTO, D., FERREIRA., P., POLETTI, C. J. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo antibiótico e/ou fitoterápico como promotores, adicionados isoladamente ou associados. **Ciência Rural**, v. 37, n. 6, p. 1760-1764, 2007.

UBA - União Brasileira de Avicultura. **Relatório Anual 2012**. 2012. Disponível em <<http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/732e67e684103de4a2117dda9ddd280a.pdf>>, acesso em 01/07/2013.

VANDERKELEN, L.; ONS, E.; VAN HERREWEGHE, J. M.; CALLEWAERT, L.; GODDEERIS, MICHELS, C. W. Role of lysozyme inhibitors in the virulence of avian pathogenic *escherichia coli*. **PLoS One**, v.7, n. 9, p.e45954, 2012.

VOEHRINGER, D. Protective and pathological roles of mast cells and basophils. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 13, n. 5, p. 362-375, 2013.

WIJGA, S.; PARMENTIER, H. K.; NIEUWLAND, M. G. B.; BOVENHUIS, H. Genetic parameters for levels of natural antibodies in chicken lines divergently selected for specific antibody response. **Poult. Sci.**, v. 88, p. 1805-1810, 2009.

WIGHT, P. A. L; BURNS, B; ROTHWELL, B; MACKENZIE, G. M. The harderian gland of the domestic fowl. **J. Anat.**, v. 110, n. 2, p. 307-315, 1971.

WILLS-KARP, M. Complement activation pathways: A bridge between innate and adaptive immune responses in asthma. **Proc. Am. Thorac. Soc.**, v. 4, p. 247-251, 2007.

ZHOU, H.; LAMONT, S. J. Associations of six candidate genes with antibody response kinetics in hens. **Poult. Sci.**, v. 82, p. 1118-1129, 2003.

ZHOU, H.; BUITENHUIS, A. J.; WEIGEND, S.; LAMONT, S. J. candidate gene promoter polymorphisms and antibody response kinetics in chickens: interferon- γ , interleukin-2, and immunoglobulin light chain. **Poult. Sci.**, v. 80, p. 1679-1689, 2001.