

EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS COM O PROCESSO DE APOPTOSE NAS CÉLULAS DO JEJUNO PARASITADAS POR DIFERENTES ESPÉCIES DE *EIMERIA*

Emanoele de Oliveira dos Santos (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Angélica de Souza Khatlab (Coorientadora), Thais de Souza Feriani (Participante), Eliane Gasparino (Orientadora). e-mail: egasparino@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências Agrárias/Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento conforme tabela do [CNPq/CAPES](#): Zootecnia/5.04.02.00-5-Genética e Melhoramento dos Animais Domésticos

Palavras-chave: infecção intestinal, morte celular, oocistos

Resumo:

Nosso objetivo foi avaliar o efeito do desafio por *Eimeria* spp., sobre o número de enterócitos, e a expressão de genes relacionados com o processo de apoptose celular no jejuno de frangos de corte seis dias pós inoculação (6 dpi) com oocistos esporulados de *Eimeria* spp. Para isso, 96 frangos de corte machos com um dia de idade, isentos de vacina anticoccidiana foram utilizados. Aos 14 dias de idade, os frangos do grupo desafiado por *Eimeria* spp. (DE, $n=48$) receberam por via oral 1 mL de solução contendo oocistos esporulados de *Eimeria* spp. (2×10^4 *E. acervulina*, 2×10^4 *E. praecox*, $1,6 \times 10^4$ *E. maxima* e 4×10^4 *E. mitis*). O outro grupo (sem desafio por *Eimeria* spp., SDE, $n=48$), recebeu por via oral 1 mL de solução salina. Após o período de 6 dpi, aos 20 dias de idade, seis aves de cada tratamento foram abatidas por deslocamento cervical, para a coleta de amostras do jejuno. Não foi verificado oocistos de *Eimeria* spp. nas excretas dos frangos SDE, o que valida o uso desses animais como controle experimental. A infecção causada por *Eimeria* spp. em frangos DE foi confirmada pela presença de oocistos em suas excretas. Foi observado que os frangos DE apresentaram menor número de enterócitos em seus vilos, e menor expressão dos genes linfoma de células B2 (*BCL2*), proteína X associada a BCL-2 (*BAX*) e caspase 3 (*CASP3*) no jejuno 6 dpi. Os resultados demonstraram a perda celular nos vilos do jejuno dos animais desafiados, contudo a menor expressão dos genes envolvidos no processo de apoptose observada neste estudo, sugere que a perda celular nesse caso possa ocorrer por outro tipo de morte celular como a necrose.

Introdução

A morte celular pode ocorrer por meio de alguns mecanismos diferentes, como, a apoptose, que é um processo de morte celular programada, regulado por muitos genes (Vaux e Strasser, 1996). Esse processo celular é reconhecido como parte normal do desenvolvimento e homeostase dos tecidos dos animais, por ser responsável pela manutenção do equilíbrio celular entre proliferação e morte (Vaux e Strasser, 1996). A morte celular é

responsável pela eliminação de células danificadas que perderam suas funções, ou células indesejadas presentes nos tecidos biológicos, para manter assim uma quantidade constante da população celular (Vaux e Strasser, 1996). A apoptose pode ainda atuar como um importante mecanismo de defesa, por eliminar células danificadas ou infectadas por patógenos intracelulares, o que poderia eliminar o patógeno no estágio inicial da infecção sem emitir sinal de alarme (Ashida et al., 2011). Agentes patogênicos, incluindo as espécies do gênero *Eimeria*, ao penetrarem no intestino e com o desenvolvimento do seu ciclo, promovem a ruptura e morte das células, entretanto, ao mesmo tempo, esses agentes são fortemente dependentes de células e das suas funções. Assim, os patógenos desenvolveram mecanismos capazes de permitir o seu desenvolvimento protegendo-os da morte. del Cacho et al. (2004) fornecem evidências que as *Eimeria* spp. lançam mão de algumas estratégias para garantir o seu ciclo de vida na célula, garantindo assim a sua sobrevivência intracelular. del Cacho et al. (2004) sugerem ainda que quando necessário as *Eimeria* spp. podem desencadear a apoptose celular para facilitar a sua liberação dos enterócitos, permitindo que as mesmas invadam células vizinhas e escapem da ação de células imunológicas (Ashida et al., 2011). Nesse contexto, nosso objetivo foi avaliar se a perda celular do jejuno durante a infecção intestinal por *Eimeria* spp. poderia ser provocada pelo processo metabólico de apoptose.

Materiais e métodos

Este estudo foi realizado de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA - nº 4000170615) da Universidade Estadual de Maringá. Um total 96 frangos de corte machos (Cobb 500) de um dia de idade (isentos de vacina anticoccidiana) foram utilizados. Os frangos foram alojados em gaiolas metálicas suspensas, equipadas com comedouro e bebedouro, em ambiente climatizado seguindo as recomendações da linhagem Cobb 500. Os frangos foram distribuídos em dois tratamentos: sem desafio por *Eimeria* spp. (SDE $n=48$) e desafio por *Eimeria* spp. (DE $n=48$). Aos 14 dias de idade, os frangos do grupo DE receberam por via oral 1 mL de solução contendo oocistos esporulados de *Eimeria* spp. (2×10^4 *E. acervulina*, 2×10^4 *E. praecox*, $1,6 \times 10^4$ *E. maxima* e 4×10^4 *E. mitis*). O grupo SDE, recebeu por via oral 1 mL de solução salina. Os animais pertencentes aos tratamentos SDE e DE, foram alojados separadamente para evitar infecção cruzada. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições, e seis aves por tratamento. As rações foram formuladas com milho e farelo de soja para atender suas exigências nutricionais. Todas as aves foram abatidas por deslocamento cervical 6 dpi aos 20 dias de idade, para a coleta de amostras. Durante todo o período experimental, os animais tiveram livre acesso à água e a ração. Nenhum anticoccidiano foi adicionado às rações.

A análise coprológica qualitativa (presença ou ausência de oocistos) foi realizada para confirmar a infecção por *Eimeria* spp. nos frangos. Para isso, 6 dpi, um pool de amostras de excretas frescas foi retirado aleatoriamente

das gaiolas dos animais DE e SDE. Dois gramas de excretas foram dissolvidos em 15 mL de água destilada e centrifugadas a 2500 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pelet foi dissolvido em 10 mL de solução de sacarose (densidade 1,18). Essa mistura foi centrifugada a 2500 rpm por 2 minutos e a solução obtida foi colocada em lâmina histológica para detecção dos oocistos. A visualização das lâminas foi realizada em microscópio Óptico P1 Olympus BX 50, acoplado com a câmera Olympus PMC 35 B utilizando objetiva de 40x. Para as análises histológicas, o jejuno, de seis animais por tratamento, foi coletado após a eutanásia dos animais 6 dpi. As amostras de jejuno foram coletadas, abertas longitudinalmente e lavadas cuidadosamente com solução fisiológica estéril gelada e, em seguida foram fixadas em solução de Bouin. Os cortes histológicos semi-seriados foram feitos no sentido longitudinal (3 µm de espessura) e foram corados com Hematoxilina-Eosina. O número de enterócito no vilão do jejuno, foi determinado em 16 imagens por animal na objetiva de 40x. As imagens foram capturadas em microscópio Óptico P1 Olympus BX 50 acoplado com a câmera Olympus PMC 35 B. A contagem dos enterócitos foi realizada utilizando o sistema Image Pro Plus versão 4.0 (Média Cibertecnicos). Para a análise de expressão gênica, o jejuno de seis aves de cada tratamento foi coletado, lavado com soro fisiológico estéril gelado, e adicionado em microtubo contendo 1 mL de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), sendo subsequentemente armazenado em freezer -80°C até o momento da análise. O RNA total foi extraído com o uso do reagente TRIzol, seguindo as recomendações do fabricante. O RNA total foi quantificado utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000-c (ThermoFisher Scientific), no comprimento de onda de 260 nm, e a sua pureza foi analisada por meio da relação 260/280. O RNA total foi tratado com o kit DNase I amplification grade (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada, utilizando o kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen Corporation, Brazil), de acordo com as instruções do fabricante. As reações em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), foram realizadas utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Os primers linfoma de células B2 (*BCL2*, NM_205339.2), proteína X associada a BCL-2 (*BAX*, XM_001235092.4) e caspase 3 (*CASP3*, NM_204725.1), foram desenhados com base nas sequências dos genes depositadas no NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov, usando o site www.idtdna.com. O gene β -actina (L08165.1) foi utilizado como controle endógeno. As análises foram realizadas em duplicatas e a quantificação relativa de expressão dos genes foi calculada por meio do método $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Os resultados estão expressos como unidade arbitrária (UA). Os dados foram analisados por meio da ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste t de Student ($P < 0,05$) (SAS, 2002 versão 9.00, SAS Inst. Inc., Cary, NC).

Resultados e Discussão

A ausência de oocistos nas excretas de frangos de corte SDE valida o uso desses animais como controle experimental, e a infecção causada por *Eimeria*

spp. em frangos DE foi confirmada pela presença de oocistos em suas excretas. Os frangos DE apresentaram menor número de enterócitos em seus vilos, (207, 98 vs. 280,94), e menor expressão dos genes *BCL2* (0,003 vs. 0,006 UA), *BAX* (0,047 vs. 0,071 UA) e *CASP3* (0,085 vs. 0.122 UA) no jejuno 6 dpi, do que os frangos SDE, respectivamente. Segundo Abdel-Halem et al. (2017) a perda celular do intestino pode estar relacionada com o mecanismo de apoptose, que é responsável pela eliminação de células danificadas que perderam suas funções, ou células indesejadas (Vaux e Strasser, 1996). A apoptose pode atuar ainda como um mecanismo de defesa por eliminar células infectadas por patógenos intracelulares (Williams, 1994). No entanto, as *Eimeria* spp. dispõem de estratégias para garantir o seu ciclo de vida na célula, inibindo a via da apoptose (del Cacho et al., 2004). Os resultados deste estudo sugerem que, com a menor expressão do gene *BCL2*, as células epiteliais do jejuno estivessem mais vulneráveis a sofrerem apoptose. E que possivelmente a *Eimeria* bloqueou a via da apoptose, com consequente inibição dos genes *BAX* e *CASP3*, a fim de facilitar a sua sobrevivência e disseminação celular. Como os resultados mostraram menor número de enterócitos nos frangos DE, nós sugerimos a ocorrência de outro tipo de morte celular como a necrose, que é um mecanismo patológico ligado a perda da integridade das membranas.

Conclusões

Os resultados sugerem que a perda de enterócitos observada nos vilos do jejuno dos animais desafiados, possa ocorrer por outro tipo de morte celular que não o de apoptose.

Agradecimentos

A Universidade Estadual de Maringá, ao Departamento de Zootecnia pelo apoio técnico, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Referências

- ABDEL-HALEEM, H. M.; ABOELHADID, S. M.; SAKRAN, T.; EL-SHAHAWY, G.; EL-FAYOUMI, H.; AL-QURAI SHY, S.; ABDEL-BAKI, A. S. Gene expression, oxidative stress and apoptotic changes in rabbit ileum experimentally infected with *Eimeria intestinalis*. **Folia Parasitologica**, v. 64, n. 19, p. 1-7, 2017.
- ASHIDA, H.; MIMURO, H.; OGAWA, M.; KOBAYASHI, T.; SANADA, T.; KIM, M.; SASAKAWA, C. Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival. **The Journal of Cell Biology**, v. 195, n. 6, p. 931-942, 2011.
- DEL CACHO, E.; GALLEGRO, M.; LÓPEZ-BERNAD, F.; QUÍLEZ, J.; SÁNCHEZ-ACEDO, C. Expression of anti-apoptotic factors in cells parasitized by second-generation schizonts of *Eimeria tenella* and *Eimeria necatrix*. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3-4, p. 287-300, 2004.

VAUX, D. L.; STRASSER, A. The molecular biology of apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 6, p. 2239-2244, 1996.

WILLIAMS, G. T. Programmed cell death: a fundamental protective response to pathogens. **Trends in Microbiology**, v. 2, n. 12, p. 463-464, 1994.