



**LUCAS JANUZZI LARA**

**AVALIAÇÃO *In Silico* DE MARCADORES  
MOLECULARES DA RESPOSTA  
IMUNOLÓGICA ASSOCIADOS AO ESTRESSE  
DE AVES**

**LAVRAS – MG**

**2016**

**LUCAS JANUZZI LARA**

**AVALIAÇÃO *In Silico* DE MARCADORES MOLECULARES DA  
RESPOSTA IMUNOLÓGICA ASSOCIADOS AO ESTRESSE DE AVES**

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

Profa. Dra. Ana Paula Peconick

Orientadora

Prof. Dr. Édison José Fassani

Profa. Dra. Priscilla Rochele Barrios Chalfun

Coorientadores

**LAVRAS – MG**

**2016**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Lara, Lucas Januzzi.

Avaliação *In Silico* de marcadores moleculares da resposta  
imunológica associados ao estresse de aves / Lucas Januzzi Lara. –  
Lavras : UFLA, 2016.

81p. : il.

Dissertação(mestrado acadêmico)–Universidade Federal de  
Lavras, 2016.

Orientador: Ana Paula Peconick.

Bibliografia.

1. Imunologia. 2. Estresse. 3. Avicultura. 4. Bioinformática. 5.  
Marcador molecular. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**LUCAS JANUZZI LARA**

**AVALIAÇÃO *In Silico* DE MARCADORES MOLECULARES DA  
RESPOSTA IMUNOLÓGICA ASSOCIADOS AO ESTRESSE DE AVES**

***In Silico* EVALUATION OF IMMUNE RESPONSE MOLECULAR  
MARKERS ASSOCIATED TO POULTRY STRESS**

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

APROVADA em 05 de Agosto de 2016.

Prof. Dr. Djeison Lutier Raymundo UFLA

Prof. Dr. Thales Augusto Barçante UFLA

Profa. Dra. Ana Paula Peconick  
Orientadora

Prof. Dr. Édison José Fassani  
Coorientador

**LAVRAS – MG**

**2016**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me abençoado com minha família, amigos e oportunidades que me fizeram chegar até aqui.

Aos meus pais, Luiz e Marcia, pelo apoio, quando eu decidi continuar estudando, para que eu pudesse realizar meus sonhos.

Aos meus irmãos, Caroline e Tiago, que serão meus eternos amores e sempre os levarei comigo.

À Vó Rita e aos avós *in memoriam* (Conceição, Tunico, Braz) que sempre torceram pela minha vitória.

Aos meus cunhados, Carla e Renan, que sempre me ouvem falar do meu trabalho e me ajudam a cuidar dos meus irmãos.

À minha família, Tios e Tias, em especial, João e Ângela, que me viram chorar e, ainda sim, deram-me forças para voltar a Lavras e continuar a caminhada. Aos primos e primas que, com o passar do tempo, separamo- nos apenas pela distância.

Aos meus amigos, que me escutaram, apoiaram e, muitas vezes, deram-me um copo de cerveja, para jogar conversa fora e eu não me esquecer de que precisamos de humanos por perto!!!

Aos meus coorientadores, Édison e Priscilla (e o pequeno Matheus), que me ajudaram em todos os momentos que precisei. Nas conversas, nas risadas e no apoio da dissertação e experimento.

Ao Marcos Rostagno, que, mesmo depois de 4 anos de estágio, continua acreditando em mim e me apoiando nas minhas decisões.

À FAPEMIG, ao CAPES, CNPq pelo apoio financeiro de bolsa e projeto.

Ao Sirius Black, meu Bulldog Francês, que me entende só de me olhar.

A todos aqueles que, de alguma forma, ajudaram-me e foram importantes para o meu crescimento pessoal e profissional.

Muito obrigado!!!

### **Agradecimento Especial**

À minha orientadora, Ana Paula Peconick e toda sua família, que me acolheram como um deles. Além de toda a fé que possui em mim, fez-me crescer como pessoa e profissional. Aceita todas as minhas ideias loucas de abraçar o mundo e sempre me deu todo o suporte, intelectual e emocional, para tanto. Mais do que uma orientadora, após um ano e meio de mestrado, tenho a certeza de que nossa amizade é para sempre.

Muito obrigado, Ana!!!

Esperança é desejar que algo aconteça;  
fé é acreditar que algo vai acontecer;  
ter coragem é fazer acontecer  
(Autor Desconhecido).

## RESUMO GERAL

O estresse é caracterizado como uma resposta inespecífica a quaisquer desafios, práticas de manejo como desconforto térmico, vacinação e debicagem, problemas de socialização, privação de alimento, dentre outros. Verifica-se que o estresse pode reduzir a resposta imune das aves e aumentar a predisposição a infecções e doenças, situação que remete a prejuízos econômicos por retardo da produção e/ou reprodução. Em aves, os mecanismos moleculares envolvidos no estresse e alteração da resposta imune, ainda, são pouco conhecidos. Sendo assim, o objetivo da presente proposta foi investigar marcadores moleculares expressos em aves quando em estresse. Foram selecionadas 15 sequências genéticas de RNA mensageiro relacionadas com o seu sistema imune. Também foi realizada a predição do escore máximo de antigenicidade da proteína que cada sequência seria traduzida. Os resultados demonstraram que não há homologia entre as sequências selecionadas de aves com as de mamíferos. Das 15 sequências, foi realizada a predição do RNAm de 10, isso, porque outras 5 apresentavam tamanho superior a 2500 nucleotídeos, sendo inviável a leitura pelo *software*. Vinte estruturas secundárias com a mínima energia livre foram analisadas para cada sequência. Foram eleitas as com menor energia, ou seja, com maior estabilidade. Na predição da antigenicidade dos epítomos, houve 8934 resultados e foram eleitos aqueles que apresentaram maior escore de antigenicidade. Esse resultado corroborou para a continuação das análises, uma vez que é necessário o entendimento das estruturas secundárias de RNA mensageiro e da antigenicidade dos epítomos, para o desenvolvimento de plataforma de diagnóstico rápido, para auxiliar os produtores a identificar lotes de animais que estão sobre estresse e, assim, melhorar a sanidade, bem-estar animal e aumento da sua produtividade.

**Palavras-chave:** Aves. Bioinformática. Estresse. Imunologia. Marcador molecular.



## GENERAL ABSTRACT

Stress can be characterized as an unspecific response to any challenge such as beak trimming, thermal discomfort, social issues, feed deprivation, etc. It is known that stress modifies poultry immune response and increases pathogen infections leading to economic losses caused by production and reproduction delay. Studies have been done to identify different protein expressions under stress on different species. However, poultry did not have those stress modulation and alteration by stress elucidated. Therefore the aim of this study was to investigate expressed stress molecular markers on poultry. We selected 15 mRNA genetic sequences related to the immune system. Results showed a non-homology between poultry and mammal sequences. From 15 sequences, 5 could not be predicted because they were more than 2500 nucleotides; from the other 10 sequences the analysis showed 20 conformational structures per each and the most stable sequence was accepted by the Minimum Free Energy. The highest antigenic epitopes were accepted by the maximum score, a total of 8934 epitopes were predicted and 15 were taken. These results will support future studies to expand understanding on how stress can modulate the immune system and possibilities to have a rapid diagnostic, helping on increasing animal welfare, biosecurity and productivity.

**Keywords:** Poultry. Bioinformatics. Stress. Immunology. Molecular marker.

## LISTA DE SIGLAS

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
HSP	Proteína de Choque Térmico (do inglês, <i>Heat Shock Protein</i> )
INF $\gamma$	Interferon Gama
MFE	<i>Minimum Free Energy</i>
IL	Interleucina
PRR	Receptor de Reconhecimento de Padrão
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
RNA	Ácido Ribonucleico
TCR $\gamma\delta$	Receptor de Célula T Gama Delta
TNF $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	11
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
<b>2.1</b>	<b>A avicultura nacional</b> .....	15
<b>2.2</b>	<b>Estresse em aves</b> .....	15
<b>2.3</b>	<b>Sistema Imune das aves</b> .....	16
<b>2.3.1</b>	<b>Marcadores moleculares</b> .....	19
<b>2.3.2</b>	<b>Análises de bioinformática</b> .....	20
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	23
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	24
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGO</b> .....	30
	<b>ARTIGO 1 - PREDICTED FILOGENY, SECONDARY CONFORMATIONAL STRUCTURE AND EPITOPE ANTIGENICITY OF IMMUNOLOGICAL MOLECULAR MARKERS OF STRESS ON POULTRY</b> .....	30

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1 INTRODUÇÃO**

A produção industrial de animais, especialmente, aves, pode sofrer prejuízos provenientes de fatores estressantes, provocando alterações na fisiologia e na saúde do animal, prejudicando o seu desempenho. Um exemplo da importância do estresse, na produção animal, é a perda econômica gerada, anualmente, nos Estados Unidos da América, por exemplo, que varia entre 125 a 165 milhões de dólares (BJORKQUIST et al., 2015). Por definição clássica, o estresse é caracterizado como uma resposta inespecífica a quaisquer desafios, em que o eixo hipotalâmico-adeno-hipofisário (HPA) modula diferentes respostas no organismo (GUYTON; HALL, 2006).

O estresse pode ser provocado por diversos fatores como desconforto térmico (BOZKURT et al., 2012; SOHAIL et al., 2012), problemas de socialização, privação de alimento, dentre outros (GODBOUT; GLASER, 2006). Esses fatores reduzem a resposta imune e aumentam a predisposição à multiplicação e replicação de microorganismos patogênicos (QUINTEIRO-FILHO et al., 2010).

Em relação ao sistema imunológico das aves, existem diferentes meios para analisar o estresse como um modulador da resposta imune. Na literatura encontram-se a contagem e relação de linfócitos com heterofilos, mensuração de cortisol no sangue das aves (HONDA et al., 2015), quantificação da HSP70 (KORTE et al., 2013), dentre outros. Contudo a utilização da biologia molecular remete, para um entendimento mais aprofundado sobre a presença, expressão e mecanismos de ação dos genes, com aumento da sensibilidade e especificidade em relação a outras técnicas. A utilização de marcador molecular foi iniciada, na década de 70 e é bastante utilizada como ferramenta de genotipagem, construção de mapas genéticos (GRIFFITHS et al., 2000) ou marcadores de enfermidades,

por exemplo (KIM et al., 2014). Um segmento de DNA específico pode ser caracterizado e ser, geneticamente, representativo.

Os marcadores moleculares são considerados estáveis mesmo com uma mudança do meio em relação: à diferenciação, ao desenvolvimento, crescimento ou estado imunológico do animal (AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008). Após uma padronização dos marcadores moleculares, será possível analisar amostras de sangue provenientes de granjas, para detecção do estresse e, assim, poder contribuir para uma diminuição do impacto que causa uma vez que medidas poderão ser tomadas para aliviá-lo.

A caracterização molecular da resposta imune em aves que sofrem estresse desenvolverá uma nova perspectiva de entendimento da modulação imunológica nesses animais. O conhecimento sobre os marcadores de avaliação do estresse facilitarão futuras pesquisas nos processos de identificação de estresse no campo.

Apesar de diversos estudos, demonstrando que o estresse afeta a condição de vida dos animais (CARLSSON et al., 2014; CHANG et al., 2007; LARA; ROSTAGNO, 2013; TERLOUW et al., 2008; WIEPKEMA; KOOLHAAS, 1993), até o momento são poucas as informações que sugerem a possibilidade de persistência destes efeitos, ao longo da vida das aves e não se sabe como ocorre a modulação do sistema imune, nessas condições, o que justifica o ineditismo do presente trabalho. Uma ferramenta importante, para esse entendimento e que proporciona relevante acurácia e baixo custo é a bioinformática.

Assim sendo, o objetivo deste estudo foi investigar *in silico* possíveis marcadores moleculares expressos em aves e identificar por ontologia se as sequências genéticas são semelhantes às dos mamíferos. Além disso, predizer a conformação estrutural secundária do RNAm e predizer a antigenicidade dos epítomos das proteínas formadas pelas sequências selecionadas e, assim, em

estudos futuros, essas sequências poderão ser testadas e utilizadas com o propósito de marcadores moleculares de estresse em aves de produção e a criação de uma plataforma de imunodiagnóstico capaz de identificar o estresse, de forma rápida, segura e de baixo custo para todo o sistema avícola. A partir do conhecimento obtido nas análises, poderá ser determinada a necessidade de aplicação de medidas de intervenção e o melhor momento de fazê-las, definindo pontos estratégicos de manejo e biossegurança, além de potenciais alvos terapêuticos de prevenção e tratamento.



## REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 A avicultura nacional

A avicultura nacional tem evoluído, intensamente, nas últimas décadas tanto do ponto de vista tecnológico, como territorial, expandindo a sua presença em diversas regiões de clima tropical e temperado. O Brasil se destacou, em 2015, quando foi realizado o último censo, como o segundo maior produtor de carne de frango do mundo, quando produziu 13,146 milhões de toneladas do produto, ficou atrás dos EUA com produção de 17,971 milhões de toneladas. Brasil possui um consumo de ovos *per capita* de 182 unidades, por ano, sendo um país que possui uma produção autossuficiente na produção de ovos (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL - ABPA, 2014).

Em se tratando da produção de grande número de animais e seu processamento de produtos e subprodutos, visualizar erros de manejo, desde o início da cadeia de produção, significa minimizar prejuízos, além de garantir o bem-estar dos animais. Em aves, as duas primeiras semanas de vida são essenciais para o desenvolvimento do trato gastrointestinal e desempenho de crescimento (GEYRA; UNI; SKLAN, 2001; PEEBLES et al., 2004).

### 1.2 Estresse em aves

As aves sofrem diretamente com o estresse. Niu et al. (2009) demonstraram que frangos de corte, submetidos ao estresse térmico, aos 21 dias de idade, apresentaram baixo índice de ganho de peso e consumo alimentar comparado ao tratamento controle. Resultados semelhantes, em relação ao ganho de peso e consumo de ração, em aves submetidas ao estresse térmico, foram relatados em diversos trabalhos (DAI et al., 2009; SOHAIL et al., 2012; WILLEMSSEN et al., 2011).

Em condições de estresse, as aves aumentam a secreção de HSP70 e estudos concluíram que essa proteína de choque térmico possui um efeito



positivo na proteção intestinal (GU; TANG; YANG, 2012; GU; HAO; WANG, 2012). Outro fator estressante bastante evidenciado na produção de aves é o estresse por manipulação e transporte. Para que ocorra o carregamento, as aves entram em contato com os manipuladores e são aglomeradas em caixas que seguem, principalmente, por rodovias com privação de alimento e água, até o destino final. Dependendo de como são realizados esses procedimentos, essa situação compromete a saúde, eficiência produtiva e o bem-estar animal dessas aves (MITCHELL; KETTLEWELL, 2009).

As linhagens de postura industrial são predispostas a reações de agressividade e dentre elas podemos destacar a bicagem do canhão da pena, que contém sangue, apresentando, assim, a cor avermelhada, que é atrativo para as galinhas; esse efeito pode resultar em casos de canibalismo. Esse procedimento, se realizado de forma correta, melhora a conversão alimentar uma vez que há menor desperdício de ração e uma menor taxa de mortalidade pela diminuição da bicagem que propicia um ambiente para infecções e do canibalismo (MACK et al., 2005).

### **1.3 Sistema Imune das aves**

A resposta imunológica pode ser dividida em inata e adaptativa. Na resposta inata temos a presença de proteínas que não necessitam de uma exposição anterior à infecção (CARROLL; PRODEUS, 1998; REID et al., 2007) e dos heterófilos, que realizam a detecção do padrão molecular associado ao patógeno e a sua fagocitose, liberando fatores antimicrobianos e estimulando o organismo a debelar contra o corpo estranho (KOGUT et al., 2005).

Uma classe importante para o sistema imune inato é a dos receptores de reconhecimento de padrão (PRR). Dentro desta destacam-se os receptores semelhantes a Toll (*Toll Like Receptor*-TLR) e são descritos como os representantes mais antigos do sistema imune dos animais. Esses receptores não

possuem variação na especificidade, por isso, eles reconhecem padrões conservados de microorganismos, ou seja, regiões que não sofrem mutações, altamente específicas para o reconhecimento e que não se encontrem como regiões conservadas, no organismo do hospedeiro, evitando, assim, o seu reconhecimento como estranho (WERLING; COFFEY, 2007). O mecanismo de ativação da resposta imune inata e adaptativa pelos TLRs inicia-se com uma série de vias de sinalização (CORMICAN et al., 2009). O TLR ativa a transcrição do fator nuclear kappaB (NF-kB, do inglês *nuclear fator kappa B*), que induz a transcrição de diferentes genes relacionados a outros componentes do sistema imune como citocinas, quimiocinas e moléculas coestimulatórias que favorecem o direcionamento da resposta imune adaptativa (BIELINSKA et al., 2014). Em aves TLR 4 é importante, para reconhecimento de lipopolissacarídeos, envelopes de glicoproteínas, glicoinositol-fosfolipídeos, como exemplo, a *Salmonella entérica* serovar *Thyphimurium* (LEVEQUE et al., 2003; MALEK; HASENSTEIN; LAMONT, 2004), e o TLR 5 reconhece proteína flagelina (ex.: *E.coli* patogênica aviária) (KOGUT et al., 2006).

As citocinas são fatores importantes na resposta inata e adaptativa. São utilizadas pelo sistema imune, para realizar a sinalização celular (MOSEER et al., 2015) e, por se ligarem a receptores específicos na membrana, iniciam uma reação em cascata que propicia indução, auxílio ou inibição na regulação de novas proteínas transcritas e expressas (PENHA FILHO et al., 2012). Dentre os tipos de resposta imune, podemos observar diferentes perfis imunológicos, dentre eles, o perfil Th1 que corresponde a uma resposta pelas interleucinas (IL) 6, IL-12 e INF-  $\gamma$ ; e o perfil Th2 que é regulado pela IL-10 (HAGHIGHI et al., 2008).

O sistema imune, de uma forma geral, capacita todo o organismo para que ele seja capaz de impedir a entrada e/ou a proliferação de antígenos. Uma porta de entrada, para diferentes tipos de patógenos, é o trato gastrointestinal

(TGI). Nesse contexto, a mucosa intestinal possui uma importante função na proteção do organismo contra a infecção e na manutenção da homeostase. Em frangos de corte, o principal centro de defesa do sistema imune no TGI, utilizado para debelar patógenos, é o tecido linfoide associado ao tecido intestinal (GALT), capaz de provocar resposta frente a bactérias, vírus e parasitas patogênicos entéricos (KLIPPER; SKLAN; FRIEDMAN, 2000; MAST; GODDEERIS, 1999).

As tonsilas cecais realizam a função dos linfonodos, sendo o maior tecido linfoide do GALT, possuindo em seus centros germinativos tanto células B como T (LILLEHOJ; TROUT, 1996). É importante salientar que as células B são os linfócitos que estão em maior proporção na lâmina própria do epitélio intestinal, e as células T se encontram mais abundantes no meio e abaixo da camada de muco. O sistema imune define algumas estratégias necessárias, para modular uma resposta eficiente, frente às infecções; uma importante estratégia é a síntese de imunoglobulina (Ig) A em uma resposta não inflamatória. Após a ligação ao receptor polimérico Ig (pIgR), os dímeros de IgA são secretados pelas células intestinais B, então, denominadas de IgA secretoras (sIgA), capazes de modular diferentes rotas de proteção do hospedeiro (JAWALE; LEE, 2014; RODRIGUES et al., 2008). A secreção de IgA é controlada pelo perfil imunológico Th1 e pelas citocinas IL-6, IL-10, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (JANARDHANA et al., 2009).

Outro importante órgão imune das aves é o baço. Este é o maior órgão linfoide secundário e pode ser dividido em polpas branca e vermelha. A branca possui função de alojar linfócitos maduros, como células B produzidas e secretadas pela bolsa cloacal a qual será parte alojada no baço e parte em outros órgãos linfoides secundários. Alguns linfócitos T, também, ocupam a polpa branca em uma área denominada de zona T dependente do baço. A função da

polpa vermelha, inicialmente, é de hematopoiese seguindo para uma fase de filtração de eritrócitos senescentes (OLÁH; VERVELDE, 2008).

O sistema imunológico possui vários tipos de células que auxiliam na resposta imune. Dentre essas células, podemos destacar o linfócito T gama delta ( $\gamma\delta$ ) que possui uma afinidade por proteção da mucosa intestinal e é um dos principais elementos na defesa contra microorganismos entéricos (ZARIN et al., 2015). Essas células são comumente encontradas no sangue periférico, timo, baço e bolsa cloacal, participando, ativamente, da modulação do sistema imune (BERNDT; METHNER, 2001). Em aves, os linfócitos T  $\gamma\delta$  possuem uma proporção de 50% comparado com outras células T (DE SANTIS et al., 2015) e estudos recentes demonstraram que após infecção por *Salmonella sp.* o nível de linfócito T  $\gamma\delta$  e de linfócitos intraepiteliais intestinais aumentaram. Em consequência disso, pode-se observar uma diminuição da infecção bacteriana (LEE; LEE; LEE, 2012).

### 1.3.1 Marcadores moleculares

Marcador molecular pode ser definido como um fragmento de DNA que está localizado em determinado loco. Essa sequência de DNA tem a capacidade de identificar em um *pool* de DNA a fita alvo (AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008). A biotecnologia tem avançado, dia após dia e, com isso, a seleção de marcadores moleculares tem uma fundamental influência na melhoria do potencial produtivo, resistência a certos tipos de doenças, avaliação de respostas e é importante na conservação de espécies (SINGH et al., 2014).

Uma variação específica no código genético pode ser identificada/diferenciada pelo uso de marcadores moleculares. Essa identificação pode ser baseada em uma diferenciação fenotípica, visível ou simplesmente por acesso ao banco genético, sendo classificada quanto à visualização morfológica ou na produção gênica como os marcadores bioquímicos (AGARWAL;

SHRIVASTAVA; PADH, 2008). Uma característica que faz os marcadores moleculares serem tão usuais, no dia a dia do diagnóstico, é que uma pequena variação na sequência de DNA pode ser identificada, para a realização de identificação de indivíduos. Algumas dessas variações podem ser mutações, translocação, deleção ou inserção, além de ser possível identificar essas variações, em qualquer parte do corpo do indivíduo como tecido, sangue (CARGILL; WOMACK, 2007) e não se modificam frente ao ambiente ou efeitos epistáticos ou pleiotrópicos (AGARWAL; SHRIVASTAVA; PADH, 2008). Uma vez que o ambiente pode modificar a expressão/sequência do RNA mensageiro, o marcador molecular, por ser igual frente a esses desafios, será capaz de identificar a sequência de nucleotídeos alvo, mesmo que ocorram os processos supracitados (deleção, translocação ou inserção).

### **1.3.2 Análises de bioinformática**

Com o advento da biologia molecular, foi necessário o uso de ferramentas que possibilitasse organizar e analisar, de forma rápida e precisa, uma grande quantidade de sequências genéticas catalogadas em bancos de dados públicos e privados. A bioinformática é uma ferramenta multidisciplinar, que abrange os conceitos de biologia molecular, estatística, bioquímica, física, engenharia e informática, sendo capaz de identificar, analisar, prever e, ainda, comparar por filogenia (ontologia) as mais diversas sequências genéticas. A ontologia é importante quando há necessidade de identificar a distância genética entre uma ou mais espécies. Dependendo da distância evolutiva, podemos utilizar marcadores já estabelecidos na literatura, contudo, quando a distância não pertence à mesma raiz, temos que considerar, analisar e testar a sequência alvo, a fim de não ter homologia com outros possíveis marcadores, para a espécie, ainda, não estudada, aumentando, assim, a acurácia dos marcadores.

A análise da predição da estrutura secundária do RNAm é capaz de indicar a função que a molécula exercerá no organismo e sua estabilidade (HOFACKER; FEKETE; STADLER, 2002; KRISHNAN et al., 2008). O entendimento da conformação do polímero de RNAm pode prever os mecanismos das reações biológicas bem como compreender a estrutura proteica que determinada sequência formará e sua própria regulação gênica. Consequentemente, essa ferramenta consegue estabelecer o desenvolvimento de novos fármacos e polímeros sintéticos que possam ser capazes de bloquear processos biológicos não desejáveis (GASPAR et al., 2013). A predição tanto dos marcadores moleculares quanto da antigenicidade dos epítopos fornece resultados capazes de identificar regiões de ligação entre receptor e ligante com alta afinidade, sendo importantes para profilaxia de diversas doenças por meio da produção de vacinas e tratamento com imunoterapias (AMAT-UR-RASOOL; SAGHIR; IDREES, 2015; CHEN; RAYNER; HU, 2011; GAO et al., 2012; KRINGELUM et al., 2012; MOISE et al., 2015), bem como para a construção de ferramentas de imunodiagnóstico (BHATTACHARYYA et al., 2014) e prever epítipo, para determinada região geográfica, em que há uma diminuição do polimorfismo e, com isso, aumentam as chances de desenvolver um determinado imunobiológico para uma população específica (YANG et al., 2015).

A determinação da estrutura secundária do RNA mensageiro pode ser realizada pela maximização do número de pares de bases e pela minimização da energia livre da estrutura (MFE, do inglês *Minimum Free Energy*). A primeira pode ser definida como sendo a necessidade de obter uma estrutura em que haja a maior quantidade de pares de base complementares, na sequência de RNA. Dessa forma, será obtida uma estrutura com alta estabilidade (ZOU et al., 2009). MFE é obtida, a partir de uma função termodinâmica, denominada como energia livre de Gibbs. Nesse sistema, a estabilidade ocorre quando a energia

livre de Gibbs é mínima. Sendo assim, a molécula de RNA possui uma maior estabilidade, quando em uma determinada temperatura, obtiver a menor energia livre de Gibbs (DRORY RETWITZER et al., 2015; FU; YANG; ZHANG, 2015).

## 2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com as informações descritas, compreende-se que há necessidade de estudar os efeitos do estresse nas aves de produção tanto na fase aguda de exposição assim como os efeitos que podem provocar ao longo da sua vida. O auxílio da análise *in silico* confere um baixo custo, para iniciar a pesquisa, que tem como objetivo final encontrar os marcadores moleculares com maior estabilidade, segundo as análises de conformação estrutural do RNAm e com a maior antigenicidade dos epítomos tendo como objetivo utilizar as sequências eleitas, em futuros estudos *in vivo*, onde será possível testá-las e comprovar a sua eficiência. Os estudos seguirão tendo como alvo o desenvolvimento de um teste rápido de imunodiagnóstico, quando será possível atender à demanda das propriedades, sendo, então, capaz de identificar o estresse nas aves, em qualquer fase de criação. Dessa forma, o prejuízo relacionado ao bem-estar animal e econômico será diminuído e tanto animais e proprietários serão beneficiados com os resultados deste estudo. Isso será possível com o entendimento inicial das estruturas secundárias de RNAm e da antigenicidade dos epítomos apresentadas neste trabalho.



## REFERÊNCIAS

AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 27, n. 4, p. 617-631, 2008.

BERNDT, A.; METHNER, U. Gamma/delta T cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated *Salmonella typhimurium* strains. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 78, n. 2, p. 143-161, 2001.

BOZKURT, M. et al. Performance, egg quality, and immune response of laying hens fed diets supplemented with mannan-oligosaccharide or an essential oil mixture under moderate and hot environmental conditions. **Poultry Science**, Champaign, v. 91, n. 6, p. 1379-1386, 2012.

CARGILL, E. J.; WOMACK, J. E. Detection of polymorphisms in bovine toll-like receptors 3, 7, 8, and 9. **Genomics**, San Diego, v. 89, n. 6, p. 745-755, 2007.

CARLSSON, E. et al. Psychological stress in children may alter the immune response. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 192, n. 5, p. 2071-2081, 2014.

CARROLL, M. C.; PRODEUS, A. P. Linkages of innate and adaptive immunity. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 10, n. 1, p. 36-40, Feb. 1998.

CHANG, C. K. et al. Oxidative stress and ischemic injuries in heat stroke. **Progress in Brain Research**, Amsterdam, v. 162, n. 6, p. 525-546, 2007.

CHEN, P.; RAYNER, S.; HU, K. H. Advances of bioinformatics tools applied in virus epitopes prediction. **Virologica Sinica**, Beijing, v. 26, n. 1, p. 1-7, Feb. 2011.

CORMICAN, P. et al. The avian Toll-Like receptor pathway-Subtle differences amidst general conformity. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 33, n. 9, p. 967-973, 2009.

DAI, S. F. et al. Dietary glutamine supplementation improves growth performance, meat quality and colour stability of broilers under heat stress. **British Poultry Science**, London, v. 50, n. 3, p. 333-340, 2009.

GU, H.; TANG, C.; YANG, Y. Psychological stress, immune response, and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, Limerick, v. 223, n. 1, p. 69-77, 2012.

GU, X. H.; HAO, Y.; WANG, X. L. Overexpression of heat shock protein 70 and its relationship to intestine under acute heat stress in broilers: 2., intestinal oxidative stress. **Poultry Science**, Champaign, v. 91, n. 4, p. 790-799, 2012.

HAGHIGHI, H. R. et al. Cytokine gene expression in chicken cecal tonsils following treatment with probiotics and Salmonella infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 126, n. 1, p. 225-233, 2008.

HOFACKER, I. L.; FEKETE, M.; STADLER, P. F. Secondary structure prediction for aligned RNA sequences. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 319, n. 5, p. 1059-1066, June 2002.

HONDA, B. T. B. et al. Effects of heat stress on peripheral T and B lymphocyte profiles and IgG and IgM serum levels in broiler chickens vaccinated for Newcastle disease virus. **Poultry Science**, Champaign, v. 94, n. 10, p. 2375-2381, 2015.

JAWALE, C. V.; LEE, J. H. Salmonella enterica serovar enteritidis ghosts carrying the Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit are capable of inducing enhanced protective immune responses. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 21, n. 6, p. 799-807, 2014.

KIM, W. H. et al. Downregulation of chicken interleukin-17 receptor A during Eimeria infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 82, n. 9, p. 3845-3854, 2014.

KLIPPER, E.; SKLAN, D.; FRIEDMAN, A. Immune responses of chickens to dietary protein antigens: I., induction of systemic and intestinal immune responses following oral administration of soluble proteins in the absence of adjuvant. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 74, p. 209-223, 2000.

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

KOGUT, M. H. et al. Toll-like receptor agonists stimulate differential functional activation and cytokine and chemokine gene expression in heterophils isolated

from chickens with differential innate responses. **Microbes and Infection**, Paris, v. 8, n. 7, p. 1866-1874, 2006.

KORTE, J. et al. 2D DIGE analysis of the bursa of Fabricius reveals characteristic proteome profiles for different stages of chicken B-cell development. **Proteomics**, New York, v. 13, n. 1, p. 119-133, 2013.

LEE, G. I.; LEE, H. M.; LEE, C. H. Food safety issues in industrialization of traditional Korean foods. **Food Control**, Guildford, v. 24, n. 1/2, p. 1-5, Mar. 2012.

LEVEQUE, G. et al. Allelic variation in TLR4 is linked to susceptibility to Salmonella enterica Serovar Typhimurium infection in chickens. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, n. 3, p. 1116-1124, Mar. 2003.

LILLEHOJ, H. S.; TROUT, J. M. Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to Eimeria parasites. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 9, n. 3, p. 349-360, 1996.

MACK, O. et al. Desempenho de poedeiras comerciais submetidas ou não a diferentes métodos de debicagem. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 1, p. 169-173, 2005.

MALEK, M.; HASENSTEIN, J. R.; LAMONT, S. J. Analysis of chicken TLR4, CD28, MIF, MD-2, and LITAF genes in a Salmonella enteritidis resource population. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, n. 4, p. 544-549, Apr. 2004.

MAST, J.; GODDEERIS, B. M. Development of immunocompetence of broiler chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 70, p. 245-256, 1999.

MOSER, E. K. et al. IL-21R signaling suppresses IL-17<sup>+</sup> gamma delta T cell responses and production of IL-17 related cytokines in the lung at steady state and after influenza a virus infection. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 4, p. 1-16, 2015.

NIU, Z. et al. Effects of different levels of selenium on growth performance and immunocompetence of broilers under heat stress. **Archives of Animal Nutrition**, Montreux, v. 63, n. 1, p. 56-65, 2009.

PENHA FILHO, R. A. C. et al. Humoral and cellular immune response

generated by different vaccine programs before and after Salmonella Enteritidis challenge in chickens. **Vaccine**, Kidlington, v. 30, n. 52, p. 7637-7643, 2012.

QUINTEIRO-FILHO, W. M. et al. Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 89, n. 9, p. 1905-1914, 2010.

REID, M. et al. Adverse health effects arising from chemicals found in food and drink reported to the national poisons information centre (London), 1998-2003. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 7, p. 783-787, July 2007.

RODRIGUES, A. C. et al. Phylogenetic analysis of Trypanosoma vivax supports the separation of South American/West African from East African isolates and a new T. vivax-like genotype infecting a nyala antelope from Mozambique. **Parasitology**, Lancaster, v. 135, n. 11, p. 1317-1328, 2008.

SOHAIL, M. U. et al. Effect of supplementation of prebiotic mannan-oligosaccharides and probiotic mixture on growth performance of broilers subjected to chronic heat stress. **Poultry Science**, Champaign, v. 91, n. 9, p. 2235-2240, 2012.

TERLOUW, E. M. C. et al. Pre-slaughter conditions, animal stress and welfare: current status and possible future research. **Animal**, Cambridge, v. 2, p. 1501-1517, Oct. 2008.

WERLING, D.; COFFEY, T. J. Pattern recognition receptors in companion and farm animals: the key to unlocking the door to animal disease? **The Veterinary Journal**, London, v. 174, n. 2, p. 240-251, 2007.

WIEPKEMA, P.; KOOLHAAS, J. Stress and animal-welfare. **Animal Welfare**, Washington, v. 2, p. 195-218, 1993.

WILLEMSSEN, H. et al. Effects of dietary supplementation of methionine and its hydroxy analog DL-2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid on growth performance, plasma hormone levels, and the redox status of broiler chickens exposed to high temperatures. **Poultry Science**, Champaign, v. 90, n. 10, p. 2311-2320, 2011.

ZARIN, P. et al. Gamma delta T-cell differentiation and effector function programming, TCR signal strength, when and how much? **Cellular Immunology**, New York, v. 296, n. 1, p. 70-75, 2015.

ZOU, Q. et al. Predicting RNA secondary structure based on the class information and Hopfield network. **Computers in Biology and Medicine**, Elmsford, v. 39, n. 3, p. 206-214, 2009.



**SEGUNDA PARTE – ARTIGO**

**ARTIGO 1 - PREDICTED FILOGENY, SECONDARY  
CONFORMATIONAL STRUCTURE AND EPITOPE ANTIGENICITY  
OF IMMUNOLOGICAL MOLECULAR MARKERS OF STRESS ON  
POULTRY**

**Elaborado de acordo com as normas do periódico Genetics and Molecular  
Research.**

Lucas Januzzi Lara <sup>1</sup>

Ana Paula Peconick <sup>1</sup>

Édison José Fassani <sup>2</sup>

Amilcar Machado Pereira Júnior <sup>1</sup>

Priscilla Rochele Barrios Chalfun<sup>1</sup>

Thales Augusto Barçante <sup>3</sup>

Joziana Muniz de Paiva Barçante <sup>3</sup>

1- Department of Veterinary Medicine- Federeal University of Lavras, UFLA- Brazil

2- Department of Animal Science- Federal University of Lavras, UFLA- Brazil

Department of Health Science- Federal University of Lavras, UFLA- Brazil

## **Predicted filogeny, secondary conformational structure and epitope antigenicity of immunological molecular markers of stress on poultry**

### Abstract

Poultry production is faced by different type of stress and its lead to an animal welfare and economic losses and also immunity decreases when animals are under stress. *In silico* analysis is important to reduce cost and also to increase results accuracy. A bioinformatics tool was used to perform ontology studies from 15 different poultry immune sequences. Also, prediction of structures of mRNA and maximum of antigenic residues were analyzed. Non homology was found between poultry and mammals sequences. It leaded to continue the prediction of new possible molecular markers. From 15 sequences, 5 could not be predicted because they were more than 2500 nucleotides; from the other 10 sequences the analysis showed 20 conformational structure per each and the most stable sequence were accept by the Minimum Free Energy. The highest antigenic epitope were accept by the maximum score, a total of 8934 epitopes were predicted and 15 were took. These results will support future studies to expand understanding on how stress can modulate the immune system and possibilities to have a rapid diagnostic, helping on increasing animal welfare, biosecurity and productivity and also developing additives to participate on the stress controlling, making animal production more sustainable.

Key words: Stress; Poultry; Bioinformatics; Prediction, mRNA; Antigenicity; Epitope; Ontology



## INTRODUCTION

Stress is a common problem on animals and humans. Negative impacts of stress on poultry industry such as production, quality and economic loss have been described for many years (DE HAAS et al., 2013; LARA; ROSTAGNO, 2013; MASHALY et al., 2004; QUINTEIRO-FILHO et al., 2010; ROZENBOIM et al., 2007; VIEIRA et al., 2008). Developed countries as United States spend between 125 to 165 million dollars with stress on poultry production per year (BJORKQUIST et al., 2015). In fact, stress response releases catecholamines (norepinephrine and epinephrine) (ASANO et al., 2012; LYTE; VULCHANOVA; BROWN, 2011), glucocorticoids (HART; KAMM, 2002; SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000) from the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) (GU; HAO; WANG, 2012) and, studies have shown a relation between all systems such as neuroendocrine, immune and gastrointestinal (OGŁODEK et al., 2014; ROBERT; LABAT-ROBERT, 2015). A difficult to understand how receptors and immune components can interact to modulate the immune response against stress is crucial to identify possibilities to modulate the immunity.

Last decade had an important impact on the molecular biology field especially on RNA study that is crucial to understand how immune components modulate the cells and their mechanisms (FRELLSEN et al., 2009). Analyze and predicted conformation structure by molecules released is a new perspective to understand, in a molecular pathway, how these molecules such as neurotransmitters, immune peptides modulate the function of a stress misbalance. For this proposal molecular tools are

important to predict this structure. A variety of studies releases several of genetic sequences each year on public/private databases and, an important tool which organizes and analyzes some characteristics of genetic sequences (ontology) and predicted a secondary conformational structure of mRNA is bioinformatics (KAIKABO; KALSHINGI, 2008; RÖMER et al., 2016). The aim of this study was evaluated the main immune components and predicted their ontology and secondary conformational structure to find possible immune molecular markers to preview binding sites to manipulate, in a short future, synthetic or recombinants peptides able to modulate the immune system and ensure how its play with another systems to regulate the acute and chronic stress suffered by poultry. And then, keep on the knowledge obtained from the analysis may be determined the need for the application of intervention measures and the best time to do it, defining strategic points of management and biosecurity, as well as potential therapeutic targets for prevention and treatment.

## **MATERIALS AND METHODS**

Firstly, a search into the literature was done for possible molecular markers which could be a link for stress response and immune components (Table 1) about mRNA from *Gallus gallus*. Those derived from innate and acquired response were selected to be analyzed by computational approaches. To measure the inheritance between the genetic sequences within species, ontology analyses were done. For all selected genes a BLAST research was performed to get a phylogenetic

tree. Moreover, for all selected genes, a prediction of the secondary mRNA was performed using an online software ([http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructure Web/Servers/ Fold /Fold.html](http://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Fold/Fold.html)) following the RNA Fold algorithm to predict the lowest free energy conformation (MATHEWS et al., 2004). After, we predicted the epitope antigenicity of all sequences searched. Briefly, the nucleotide sequences were translated into protein sequence and then epitopes antigenicity analysis were performed using an Immune Epitope Database Analysis ([http://tools .immuneepitope.org/tools/bcell/iedb\\_input](http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input)) following KOLASKAR and TONGAONKAR (1990) method.

Table 1. Selected mRNA sequences **Erro! Vínculo não válido.** Legend: I (innate), A (adaptative), HSP (Heat Shock Protein), IL (Interleukin), R (receptor), INF  $\gamma$  (Interferon Gamma), TNF  $\alpha$  (Necrosis Tumor Factor Alpha), TCR  $\gamma\delta$  (T Cell Receptor Gamma Delta), TLR (Toll Like Receptor).

## RESULTS AND DISCUSSION

After analyzed all the genetic sequences within the bioinformatics tools described above, we identified that some genes such of cytokines did not have any phylogeny cluster (Figure 1-15). The majority of cytokines receptor and Toll Like Receptor (TLR) 4 and 5 had just one root in common, specifically for TLR 4 and 5 they recognize same patters (KOGUT et al., 2006; LEVEQUE et al., 2003). Only interleukin (IL) 1 had three genetically clusters and T cell receptor gamma had a six genetically cluster. This can be explained because mammalians and poultry had different ancestors and evolutionary they took different ways.

Instead, gene homology can be found for humans and a lack of mammals contributing to use the same cell molecular marker for different species (SCHULPEN et al., 2015). An important human model for several diseases is rodent such as mice and mouse because they have a high gene homology and results can be extrapolated for humans (HUANG et al., 2016). It explains the importance of this study where poultry molecular markers are so different of a common ancestral and demonstrated a non-gene homology correlation.

Depending the evolutionary distance between phylogeny clusters may lead to use literature known molecular markers, because domains are conserved. However, when the distance do not belong to the same phylogeny cluster have to be consider analyze and test the target sequence to check possible homology between the studied specie, increasing the molecular marker accuracy (IGEA et al., 2010). From our point of view, this ontology study was crucial to define if we can use existed mammalian immune molecular markers or if we need to search for potential poultry immune molecular markers. Results showed an importance to select potential immune genes, analyze and tested them to completely understand what and how poultry immune response can be modulated by stress. Interleukin receptor can just have one root with other species because they are more conserved than soluble interleukin.

Minimum Free Energy analyses (Table 2) showed a lower energy for each mRNA sequence. It predicts that in a controlled temperature T (310.1 K -37°) the more stable conformational structure found for each sequence and in a translational biological process that follow the central dogma of molecular biology (DNA-RNA-Protein) the sequence may

approach (JAEGER; TURNER; ZUKER, 1989; KNUDSEN; HEIN, 2003). From 15 sequences, only 10 could had a prediction of mRNA because 5 of them had more than 2500 nucleotides, and the software could not analyze. So were found 200 results of MFE (20 per sequence) and the lowest MFE were selected (Figure 16-25) to be tested in a future because we want to guarantee to study the most stable secondary mRNA structure (DRORY RETWITZER et al., 2015; FU; YANG; ZHANG, 2015).

Table 2. mRNA Minimum Free Energy prediction.

Immune component	Immune response	MFE
HSP70	I	-633,7
IL1	I	-431
IL1- R	I	-533,2
IL4	A	-126,1
IL10	I	-175,7
IL10- R	I	-872,3
IL12	I	-248
INF $\gamma$	I	-297,6
INF $\gamma$ - R	I	-665,2
TNF $\alpha$	I	-207,8

Legend: MFE (Minimum Free Energy), I (innate), A (adaptative), HSP (Heat Shock Protein), IL (Interleukin), R (receptor), INF  $\gamma$  (Interferon Gamma), TNF  $\alpha$  (Necrosis Tumor Factor Alpha).

As the ontology analysis showed, our sequences did not have conserved regions for any other molecular markers already studied thus elucidate that this research is pioneer to study immune molecular markers structures on poultry. Other studies had shown the use of prediction of mRNA structure to comprehend the tertiary mRNA structure and after all the protein behavior such as positive or negative impacts into the organism (BIDA; MAHER, 2012; CONTRANT et al., 2014; FRELLSEN et al., 2009; MARASHI et al., 2006) and manipulate genetic sequence to create new recombinant vaccines for example (ILYINSKII et al., 2009).

More recently, performed an epitope antigenicity had more importance by the fact to diminished cost and get highly accuracy on developing researches of new diagnostics platform. Our antigenicity results (Table 3) and the graphic results (Figure 25-40) showed a total of 8934 different antigenic epitopes. One of maximum score of antigenicity

was taken from each sequence/protein. Our approach wanted to get the maximum score for each epitope and after all we may have the most stable structure of mRNA that leads to a most antigenic epitope to build our immune diagnostic platform stress for poultry. Other studies had shown a high performance using this analysis to get a best antigenic epitope relevant for immune diagnostic platform, vaccine production and several treatments, especially in humans (CAI et al., 2015; GOMEZ et al., 2015; HERNÁNDEZ-GUZMÁN et al., 2014; KOLASKAR; TONGAONKAR, 1990). Those results started the process to understand the immune modulation caused by stress.

Table 3. Epitope antigenicity prediction.

Immune component	Immune response	Number of epitopes	Position	Residue	Peptide	Score
HSP70	I	628	443	V	SVLVQVY	1.227
IL1	I	195	100	F	SAFFLFC	1.144
IL1- R	I	1030	16	I	AVIICVV	1.276
IL4	A	771	712	P	VVVPRAV	1.219
IL4- R	A	298	270	P	ALGPVVL	1.181
IL10	I	169	7	A	CCQALLL	1.236
IL10- R	I	561	237	L	VFVLLIL	1.251
IL12	I	356	11	V	ACCVVLA	1.281
IL12- R	I	1861	620	P	LYIPCVV	1.258
INF $\gamma$	I	158	11	L	LFVLSVI	1.217
INF $\gamma$ - R	I	561	237	L	VFVLLIL	1.251
TCR $\gamma\delta$	I, A	642	383	Y	VICYILV	1.270
TLR4	I	787	614	L	ILILVVV	1.279
TNF $\alpha$	I	142	121	I	CCLIPFC	1.256
TLR5	I	775	602	L	ILILVVV	1.279

Legend: I (innate), A (adaptative), HSP (Heat Shock Protein), IL (Interleukin), R (receptor), INF  $\gamma$  (Interferon Gamma), TCR  $\gamma\delta$  (T Cell Receptor Gamma Delta), TLR (Toll Like Receptor), TNF  $\alpha$  (Necrosis Tumor Factor Alpha)

## CONCLUSIONS

After understand how the sequences are heterologous between poultry and mammals and the biological effects may be different, we identified the necessity to predict the highest mRNA conformational structure which will lead to stress molecular markers and the highest antigenic epitope to increase the chances to develop an immunodiagnostic platform. Those results develop tolls which lead us to a new perspective to understand how stress modulate the immune response and have a tool to enhance animal welfare and reduce economic loss caused by stress on poultry production.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) and Supporting Foundation of Minas Gerais State (FAPEMIG) Federal University of Lavras (UFLA) founding.

## REFERENCES

- ABPA. Relatório Anual 2014. **União Brasileira de Avicultura**, p. 55, 2014.
- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 4, p. 617–631, 2008.
- AMAT-UR-RASOOL, H.; SAGHIR, A.; IDREES, M. Computational prediction and analysis of envelop glycoprotein epitopes of DENV-2 and DENV-3 Pakistani isolates: a first step towards Dengue vaccine development. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0119854, 2015.
- ASANO, Y. et al. Critical role of gut microbiota in the production of biologically active, free catecholamines in the gut lumen of mice. **American**



**journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 303, n. 11, p. G1288–95, 1 dez. 2012.

BERNDT, A.; METHNER, U. Gamma/delta T cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated *Salmonella typhimurium* strains. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 78, n. 2, p. 143–161, 2001.

BHATTACHARYYA, T. et al. Development of peptide-based lineage-specific serology for chronic Chagas disease: geographical and clinical distribution of epitope recognition. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 5, p. e2892, maio 2014.

BIDA, J. P.; MAHER, L. J. Improved prediction of RNA tertiary structure with insights into native state dynamics. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 18, n. 3, p. 385–93, 1 mar. 2012.

BIELINSKA, A. U. et al. Distinct pathways of humoral and cellular immunity induced with the mucosal administration of a nanoemulsion adjuvant. **Journal of Immunology**, v. 192, p. 2722–33, 2014.

BJORKQUIST, A. G. et al. Genetic Markers Found for Response to Heat Stress in Chickens. **Animal Industry Report**, v. 661, p. ASLR2997, 2015.

BOZKURT, M. et al. Performance, egg quality, and immune response of laying hens fed diets supplemented with mannan-oligosaccharide or an essential oil mixture under moderate and hot environmental conditions. **Poultry Science**, v. 91, n. 6, p. 1379–1386, 2012.

CAI, Y. et al. Computational design, functional analysis and antigenic epitope estimation of a novel hybrid of 12 peptides of hirudin and reteplase. **Journal of Molecular Modeling**, v. 21, n. 9, p. 229, 13 set. 2015.

CARGILL, E. J.; WOMACK, J. E. Detection of polymorphisms in bovine toll-like receptors 3, 7, 8, and 9. **Genomics**, v. 89, n. 6, p. 745–755, 2007.

CARLSSON, E. et al. Psychological stress in children may alter the immune response. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 192, n. 5, p. 2071–81, 2014.

CARROLL, M. C.; PRODEUS, A. P. Linkages of innate and adaptive immunity. **Current opinion in immunology**, v. 10, n. 1, p. 36–40, fev. 1998.

CHANG, C. K. et al. Oxidative stress and ischemic injuries in heat stroke.

**Progress in Brain Research**, v. 162, n. 06, p. 525–546, 2007.

CHEN, P.; RAYNER, S.; HU, K.-H. Advances of bioinformatics tools applied in virus epitopes prediction. **Virologica Sinica**, v. 26, n. 1, p. 1–7, fev. 2011.

CONTRANT, M. et al. Importance of the RNA secondary structure for the relative accumulation of clustered viral microRNAs. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 12, p. 7981–7996, 8 jul. 2014.

CORMICAN, P. et al. The avian Toll-Like receptor pathway-Subtle differences amidst general conformity. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, n. 9, p. 967–973, 2009.

DAI, S. F. et al. Dietary glutamine supplementation improves growth performance, meat quality and colour stability of broilers under heat stress. **British poultry science**, v. 50, n. 3, p. 333–40, 2009.

DE HAAS, E. N. et al. Fear, stress, and feather pecking in commercial white and brown laying hen parent-stock flocks and their relationships with production parameters. **Poultry science**, v. 92, n. 9, p. 2259–69, 2013.

DE SANTIS, M. et al. Gamma-delta T lymphocytes and 25-hydroxy vitamin D levels as key factors in autoimmunity and inflammation: the case of zoledronic acid-induced acute phase reaction. **Lupus**, v. 24, n. 4-5, p. 442–7, 2015.

DRORY RETWITZER, M. et al. An Efficient Minimum Free Energy Structure-Based Search Method for Riboswitch Identification Based on Inverse RNA Folding. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0134262, 31 jul. 2015.

FRELLSEN, J. et al. A probabilistic model of RNA conformational space. **PLoS Computational Biology**, v. 5, n. 6, p. e1000406, jun. 2009.

FU, H.; YANG, L.; ZHANG, X. An RNA secondary structure prediction method based on minimum and suboptimal free energy structures. **Journal of Theoretical Biology**, v. 380, p. 473–479, 2015.

GAO, J. et al. BEST: improved prediction of B-cell epitopes from antigen sequences. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e40104, 2012.

GASPAR, P. et al. MRNA secondary structure optimization using a correlated stem-loop prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 6, 2013.

GEYRA, A.; UNI, Z.; SKLAN, D. Enterocyte Dynamics and Mucosal Development in the Posthatch Chick. p. 776–782, 2001.

GODBOUT, J. P.; GLASER, R. Stress-induced immune dysregulation: Implications for wound healing, infectious disease and cancer. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 1, n. 4, p. 421–427, 2006.

GOMEZ, S. et al. Genome analysis of Excretory/Secretory proteins in *Taenia solium* reveals their Abundance of Antigenic Regions (AAR). **Scientific Reports**, v. 5, p. 9683, 19 maio 2015.

GRIFFITHS, A. J. et al. *An Introduction to Genetic Analysis*. 2000.

GU, H.; TANG, C.; YANG, Y. Psychological stress, immune response, and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 223, n. 1, p. 69–77, 2012.

GU, X. H.; HAO, Y.; WANG, X. L. Overexpression of heat shock protein 70 and its relationship to intestine under acute heat stress in broilers: 2. Intestinal oxidative stress. **Poultry Science**, v. 91, n. 4, p. 790–799, 2012.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Effect of Estrogen on Bone**. [s.l: s.n.].

HAGHIGHI, H. R. et al. Cytokine gene expression in chicken cecal tonsils following treatment with probiotics and Salmonella infection. **Veterinary Microbiology**, v. 126, n. 1, p. 225–233, 2008.

HART, A.; KAMM, M. A. Mechanisms of initiation and perpetuation of gut inflammation by stress. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 16, n. 12, p. 2017–2028, dez. 2002.

HERNÁNDEZ-GUZMÁN, K. et al. Construction and evaluation of a chimeric protein made from *Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase and cathepsin L1. **Journal of Helminthology**, v. 1, n. 01, p. 1–7, 2 jan. 2014.

HOFACKER, I. L.; FEKETE, M.; STADLER, P. F. Secondary structure prediction for aligned RNA sequences. **Journal of Molecular Biology**, v. 319, n. 5, p. 1059–1066, 21 jun. 2002.

HONDA, B. T. B. et al. Effects of heat stress on peripheral T and B lymphocyte profiles and IgG and IgM serum levels in broiler chickens vaccinated for Newcastle disease virus. **Poultry Science**, v. 94, n. 10, p. 2375–2381, 2015.

HUANG, W. et al. Gene expression patterns in transgenic mouse models of hypertrophic cardiomyopathy caused by mutations in myosin regulatory light chain. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 601, p. 121–132, 2016.

IGEA, J. et al. Novel intron markers to study the phylogeny of closely related

mammalian species. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, n. 1, p. 369, 2010.

ILYINSKII, P. O. et al. Importance of mRNA secondary structural elements for the expression of influenza virus genes. **Omics : a journal of integrative biology**, v. 13, n. 5, p. 421–30, out. 2009.

JAEGER, J. A.; TURNER, D. H.; ZUKER, M. Improved predictions of secondary structures for RNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 20, p. 7706–7710, out. 1989.

JANARDHANA, V. et al. Prebiotics Modulate Immune Responses in the Gut-Associated Lymphoid Tissue of Chickens 1 – 3. 2009.

JAWALE, C. V; LEE, J. H. Salmonella enterica serovar enteritidis ghosts carrying the Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit are capable of inducing enhanced protective immune responses. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 21, n. 6, p. 799–807, 2014.

KAIKABO, A. A.; KALSHINGI, H. A. Concepts Of Bioinformatics And Its Application In Veterinary Research And Vaccines Development. **Nigerian Veterinary Journal**, v. 28, n. 2, p. 39–46, 9 maio 2008.

KIM, W. H. et al. Downregulation of chicken interleukin-17 receptor A during Eimeria infection. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 9, p. 3845–3854, 2014.

KLIPPER E1; SKLAN D; FRIEDMAN A. Immune responses of chickens to dietary protein antigens. I. Induction of systemic and intestinal immune responses following oral administration of soluble proteins in the absence of adjuvant. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 74, p. 209–23, 2000.

KNUDSEN, B.; HEIN, J. Pfold: RNA secondary structure prediction using stochastic context-free grammars. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3423–3428, 1 jul. 2003.

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

KOGUT, M. H. et al. Toll-like receptor agonists stimulate differential functional activation and cytokine and chemokine gene expression in heterophils isolated from chickens with differential innate responses. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 7, p. 1866–1874, 2006.

KOLASKAR, A. S.; TONGAONKAR, P. C. A semi-empirical method for

prediction of antigenic determinants on protein antigens. **FEBS Letters**, v. 276, n. 1-2, p. 172–174, 10 dez. 1990.

KORTE, J. et al. 2D DIGE analysis of the bursa of Fabricius reveals characteristic proteome profiles for different stages of chicken B-cell development. **Proteomics**, v. 13, n. 1, p. 119–133, 2013.

KRINGELUM, J. V. et al. Reliable B cell epitope predictions: impacts of method development and improved benchmarking. **PLoS computational biology**, v. 8, n. 12, p. e1002829, 2012.

KRISHNAN, N. M. et al. Relationship between mRNA secondary structure and sequence variability in Chloroplast genes: possible life history implications. **BMC Genomics**, v. 9, n. 1, p. 48, 2008.

LARA, L. J.; ROSTAGNO, M. H. Impact of heat stress on poultry production. **Animals**, v. 3, n. 2, p. 356–369, 2013.

LEE, G.-I.; LEE, H.-M.; LEE, C.-H. Food safety issues in industrialization of traditional Korean foods. **Food Control**, v. 24, n. 1-2, p. 1–5, mar. 2012.

LEVEQUE, G. et al. Allelic Variation in TLR4 Is Linked to Susceptibility to Salmonella enterica Serovar Typhimurium Infection in Chickens. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 3, p. 1116–1124, 1 mar. 2003.

LILLEHOJ, H. S.; TROUT, J. M. Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to Eimeria parasites. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 3, p. 349–360, 1996.

LYTE, M.; VULCHANOVA, L.; BROWN, D. R. **Stress at the intestinal surface: Catecholamines and mucosa-bacteria interactions** *Cell and Tissue Research* Springer-Verlag, , 13 jan. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00441-010-1050-0>>. Acesso em: 26 jun. 2016

MACK, O. et al. Desempenho de poedeiras comerciais submetidas ou não a diferentes métodos de debicagem. **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, p. 169–173, 2005.

MALEK, M.; HASENSTEIN, J. R.; LAMONT, S. J. Analysis of chicken TLR4, CD28, MIF, MD-2, and LITAF genes in a Salmonella enteritidis resource population. **Poultry science**, v. 83, n. 4, p. 544–9, abr. 2004.

MARASHI, S. A. et al. Importance of RNA secondary structure information for yeast donor and acceptor splice site predictions by neural networks.

**Computational Biology and Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 50–57, 2006.

MASHALY, M. M. et al. Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. **Poultry science**, v. 83, n. 6, p. 889–894, 2004.

MAST J; GODDEERIS BM. Development of immunocompetence of broiler chickens. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 70, p. 245–56, 1999.

MATHEWS, D. H. et al. Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 19, p. 7287–92, 11 maio 2004.

MITCHELL, M. A.; KETTLEWELL, P. J. Welfare of poultry during transport – a review. **Poultry Welfare Symposium**, n. May, p. 90–100, 2009.

MOISE, L. et al. iVAX: An integrated toolkit for the selection and optimization of antigens and the design of epitope-driven vaccines. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 11, n. 9, p. 2312–21, 2015.

MOSER, E. K. et al. IL-21R signaling suppresses IL-17<sup>+</sup> gamma delta T cell responses and production of IL-17 related cytokines in the lung at steady state and after influenza a virus infection. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–16, 2015.

NIU, Z. et al. Effects of different levels of selenium on growth performance and immunocompetence of broilers under heat stress. **Archives of animal nutrition**, v. 63, n. 1, p. 56–65, 2009.

OGŁODEK, E. et al. The role of the neuroendocrine and immune systems in the pathogenesis of depression. **Pharmacological Reports**, v. 66, n. 5, p. 776–781, 2014.

OLÁH, I.; VERVELDE, L. 2 – STRUCTURE OF THE AVIAN LYMPHOID SYSTEM. In: **Avian Immunology**. [s.l: s.n.]. p. 13–II.

PEEBLES, E. D. et al. Relationships among Post-Hatch Physiological Parameters in Broiler Chicks Hatched from Young Breeder Hens and Subjected to Delayed Brooding Placement 1 , 2. v. 3, n. 9, p. 578–585, 2004.

PENHA FILHO, R. A. C. et al. Humoral and cellular immune response generated by different vaccine programs before and after Salmonella Enteritidis challenge in chickens. **Vaccine**, v. 30, n. 52, p. 7637–7643, 2012.

QUINTEIRO-FILHO, W. M. et al. Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 89, n. 9, p. 1905–14, 2010.

REID, M. et al. Adverse health effects arising from chemicals found in food and drink reported to the national poisons information centre (London), 1998–2003. **Food Control**, v. 18, n. 7, p. 783–787, jul. 2007.

ROBERT, L.; LABAT-ROBERT, J. **Stress in biology and medicine, role in aging** *Pathologie Biologie*, 2015.

RODRIGUES, A C. et al. Phylogenetic analysis of *Trypanosoma vivax* supports the separation of South American/West African from East African isolates and a new *T. vivax*-like genotype infecting a nyala antelope from Mozambique. **Parasitology**, v. 135, n. 11, p. 1317–1328, 2008.

RÖMER, M. et al. ZBIT bioinformatics toolbox: A web-platform for systems biology and expression data analysis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0149263, 16 fev. 2016.

ROZENBOIM, I. et al. The Effect of Heat Stress on Ovarian Function of Laying Hens. **Poult Sci**, v. 86, n. 8, p. 1760–1765, 2007.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine reviews**, v. 21, n. 1, p. 55–89, fev. 2000.

SCHULPEN, S. H. W. et al. Comparison of gene expression regulation in mouse- and human embryonic stem cell assays during neural differentiation and in response to valproic acid exposure. **Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)**, v. 56, p. 77–86, 2015.

SINGH, U. et al. Molecular markers and their applications in cattle genetic research: A review. **Biomarkers and Genomic Medicine**, v. 6, n. 2, p. 49–58, 2014.

SOHAIL, M. U. et al. Effect of supplementation of prebiotic mannan-oligosaccharides and probiotic mixture on growth performance of broilers subjected to chronic heat stress. **Poultry Science**, v. 91, n. 9, p. 2235–2240, 2012.

TERLOUW, E. M. C. et al. Pre-slaughter conditions, animal stress and welfare: current status and possible future research. **Animal**, v. 2, n. OCTOBER 2008, p. 1501–1517, 2008.

Trade of All Meats to Expand in 2016 Beef and Veal 1. 2016.

VIEIRA, F. M. C. et al. Poultry Production Losses and their Relationship with Lairage Time Effects: A Thermodynamic Study under Tropical Conditions. **Livestock Environment VIII**, n. 701, p. 625–630, 2008.

WERLING, D.; COFFEY, T. J. Pattern recognition receptors in companion and farm animals – The key to unlocking the door to animal disease? **The Veterinary Journal**, v. 174, n. 2, p. 240–251, 2007.

WIEPKEMA, P.; KOOLHAAS, J. STRESS AND ANIMAL-WELFARE. **ANIMAL WELFARE**, v. 2, p. 195–218, 1993.

WILLEMSSEN, H. et al. Effects of dietary supplementation of methionine and its hydroxy analog DL-2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid on growth performance, plasma hormone levels, and the redox status of broiler chickens exposed to high temperatures. **Poultry Science**, v. 90, n. 10, p. 2311–2320, 2011.

YANG, Y. et al. In silico design of a DNA-based HIV-1 multi-epitope vaccine for Chinese populations. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 11, n. 3, p. 795–805, 2015.

ZARIN, P. et al. Gamma delta T-cell differentiation and effector function programming, TCR signal strength, when and how much? **Cellular immunology**, v. 296, n. 1, p. 70–5, 2015.

ZOU, Q. et al. Predicting RNA secondary structure based on the class information and Hopfield network. **Computers in Biology and Medicine**, v. 39, n. 3, p. 206–214, 2009.



Supplementary material

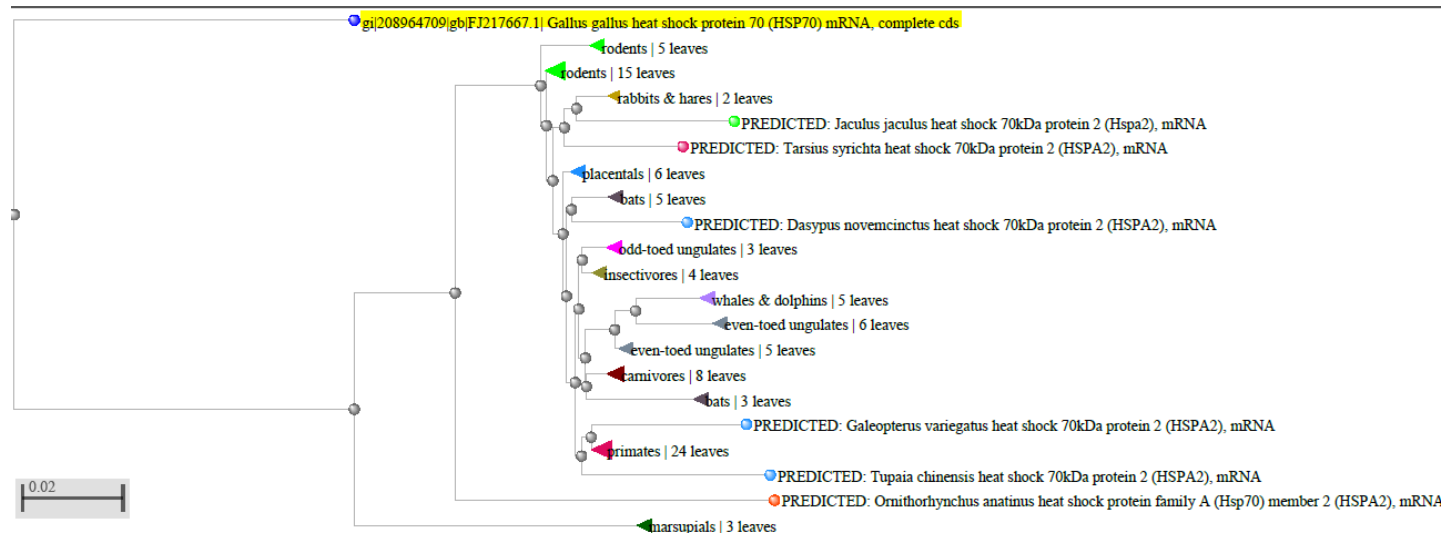
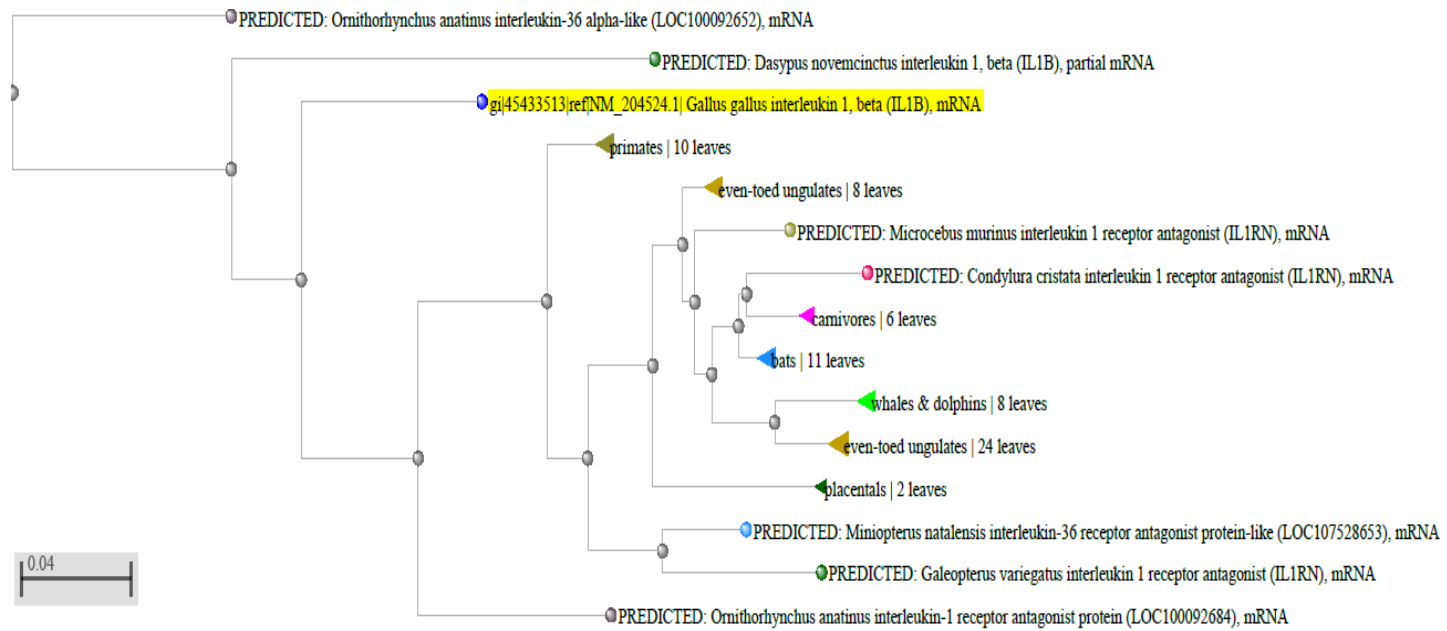
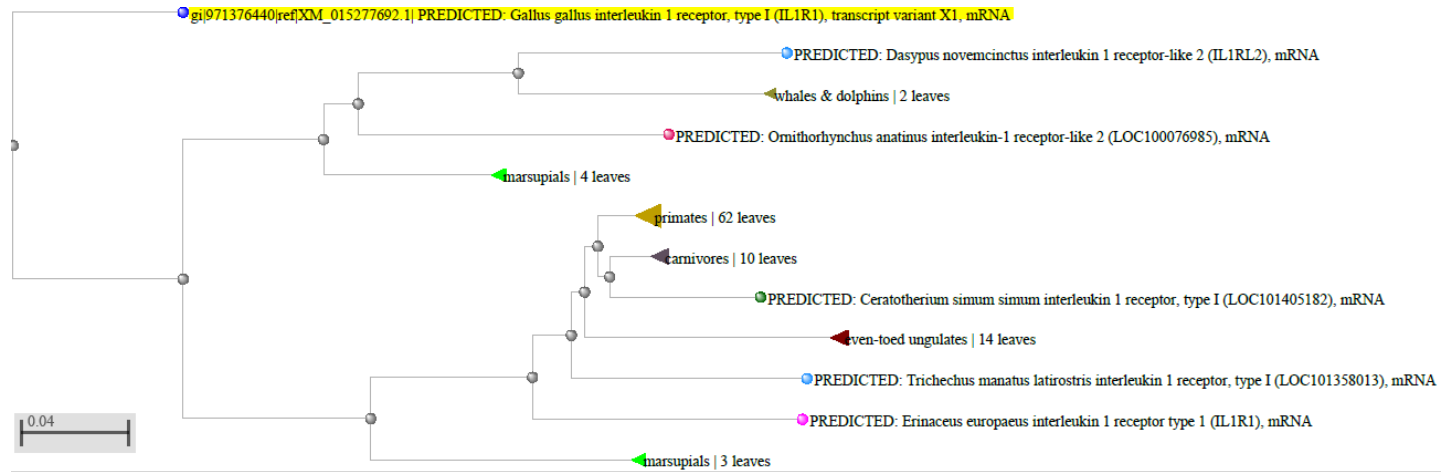


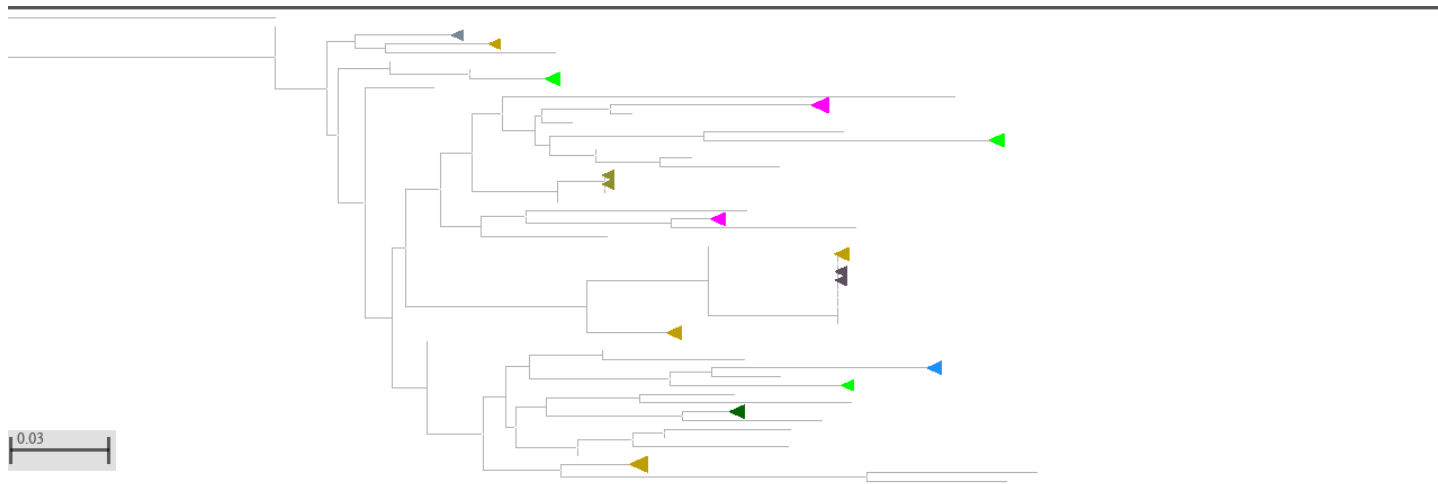
Figure 1 *Gallus gallus* Heat Shock Protein phylogenetic tree.



**Figure 2. *Gallus gallus* Interleukin 1 Beta phylogenetic tree.**



**Figure 3. *Gallus gallus* Interleukin 1 Beta receptor phylogenetic tree.**



**Figure 4.** *Gallus gallus* Interleukin 4 phylogenetic tree.

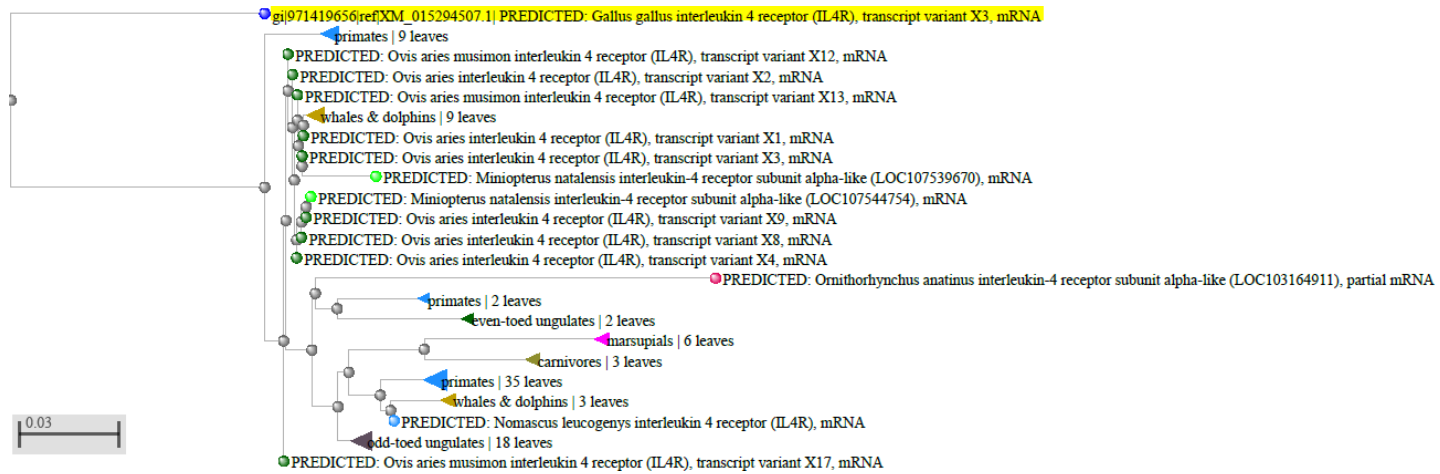
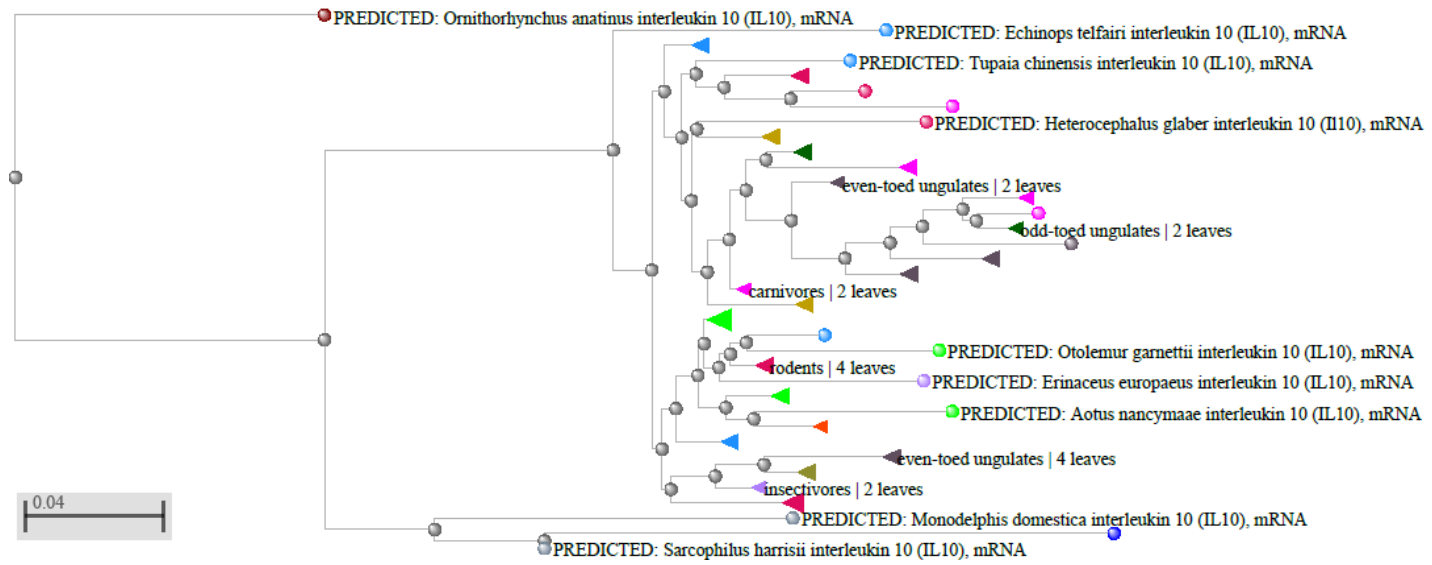
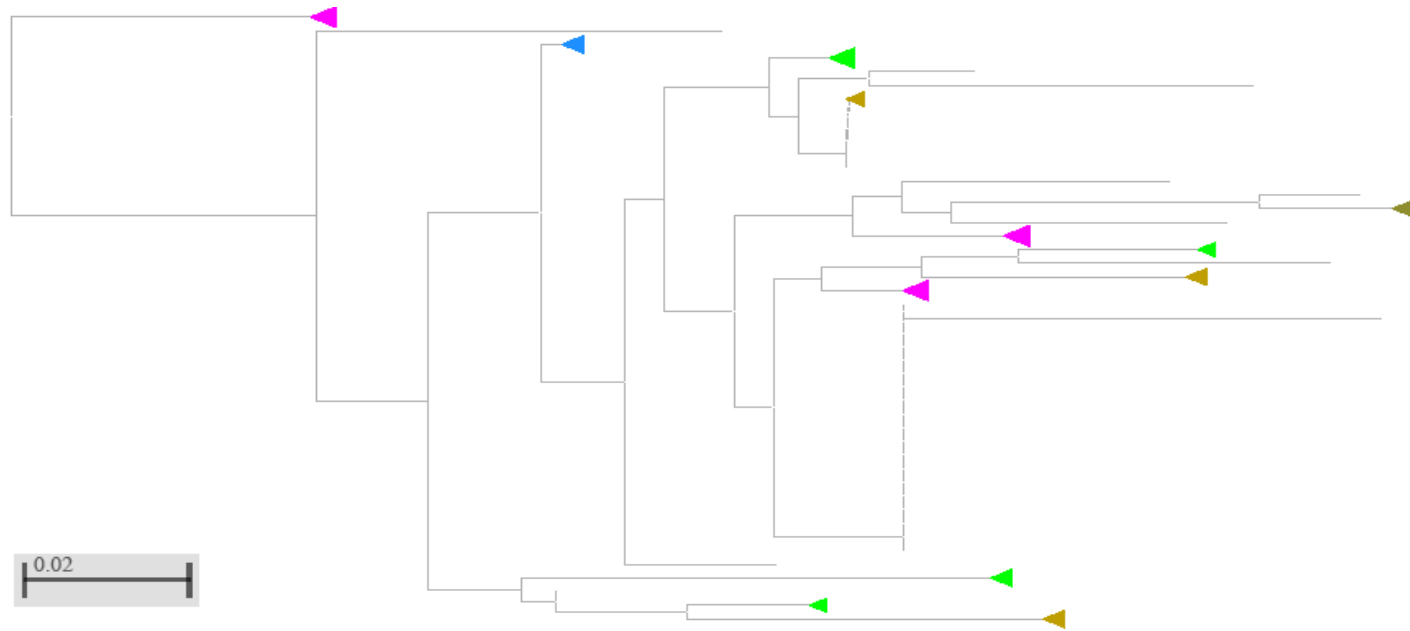


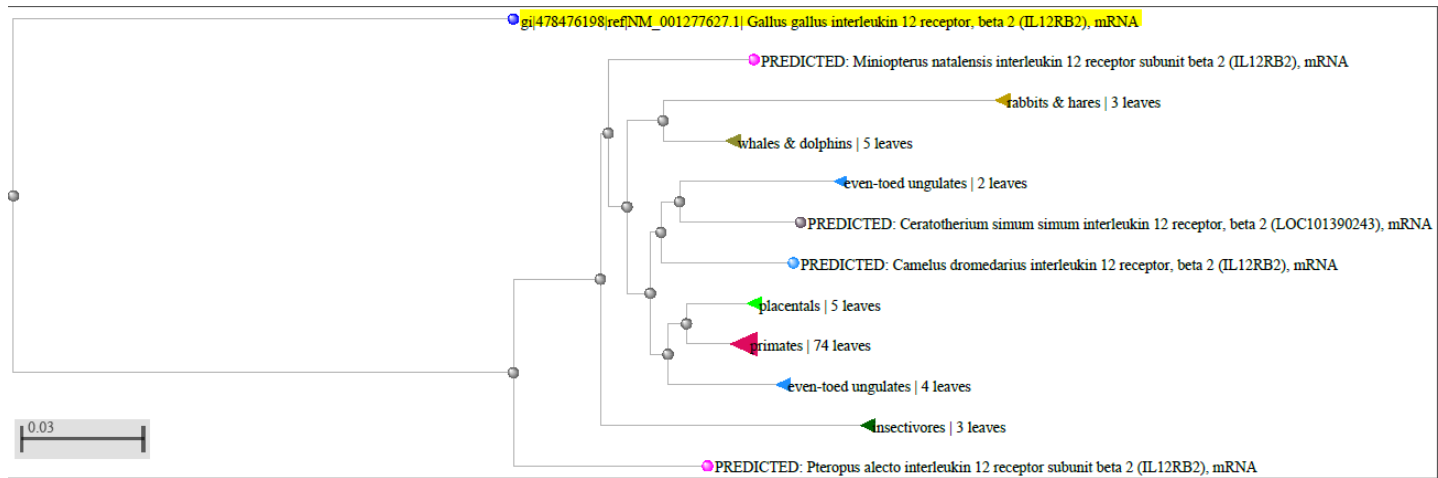
Figure 5. *Gallus gallus* Interleukin 4 receptor phylogenetic tree.



**Figure 6.** *Gallus gallus* Interleukin 10 phylogenetic tree.

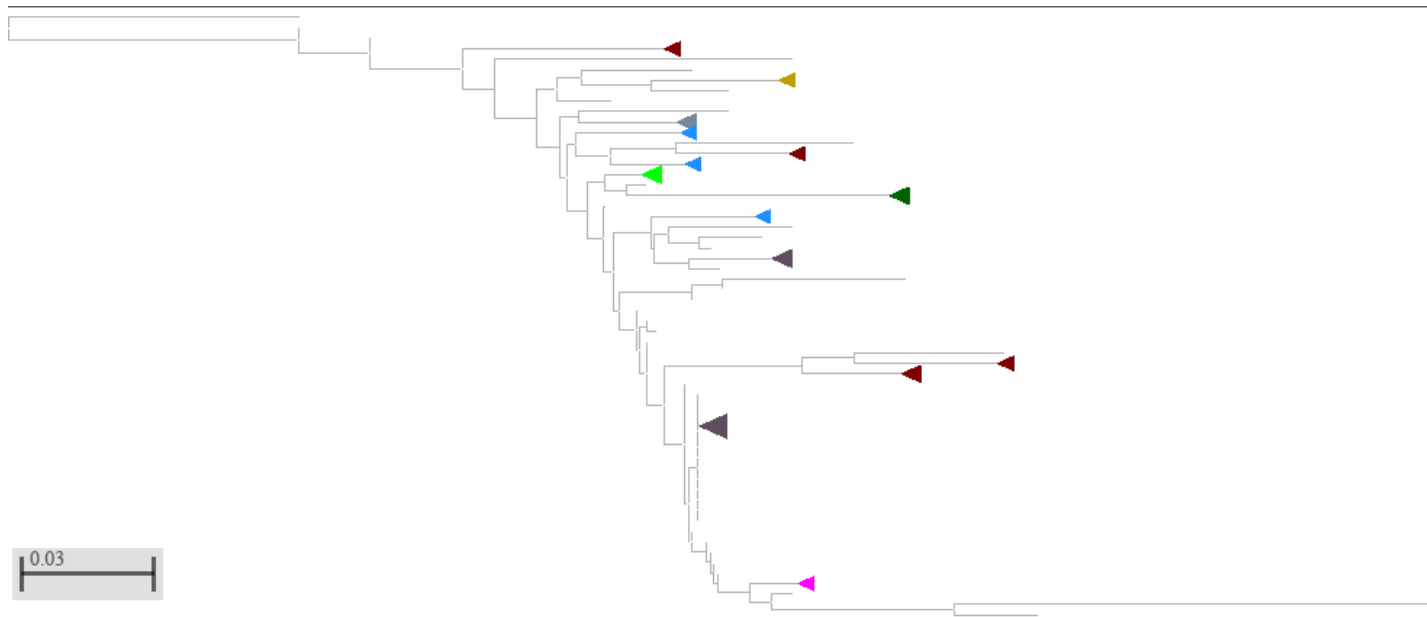


**Figure 7.** *Gallus gallus* Interleukin 10 receptor phylogenetic tree.

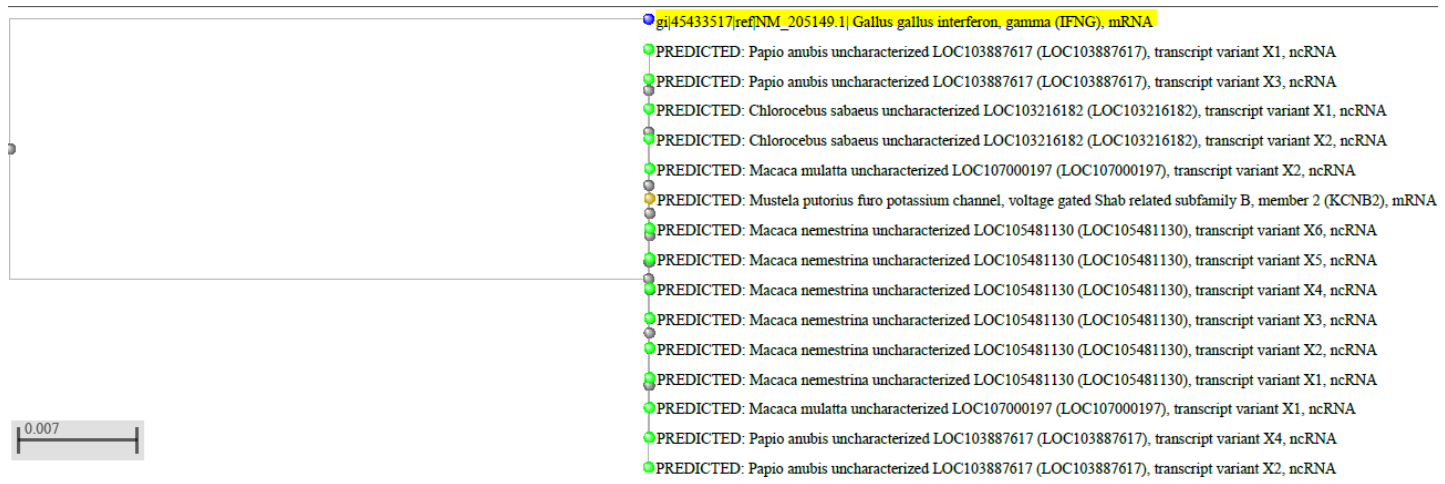


**Figure 8.** *Gallus gallus* Interleukin 12 receptor phylogenetic tree.

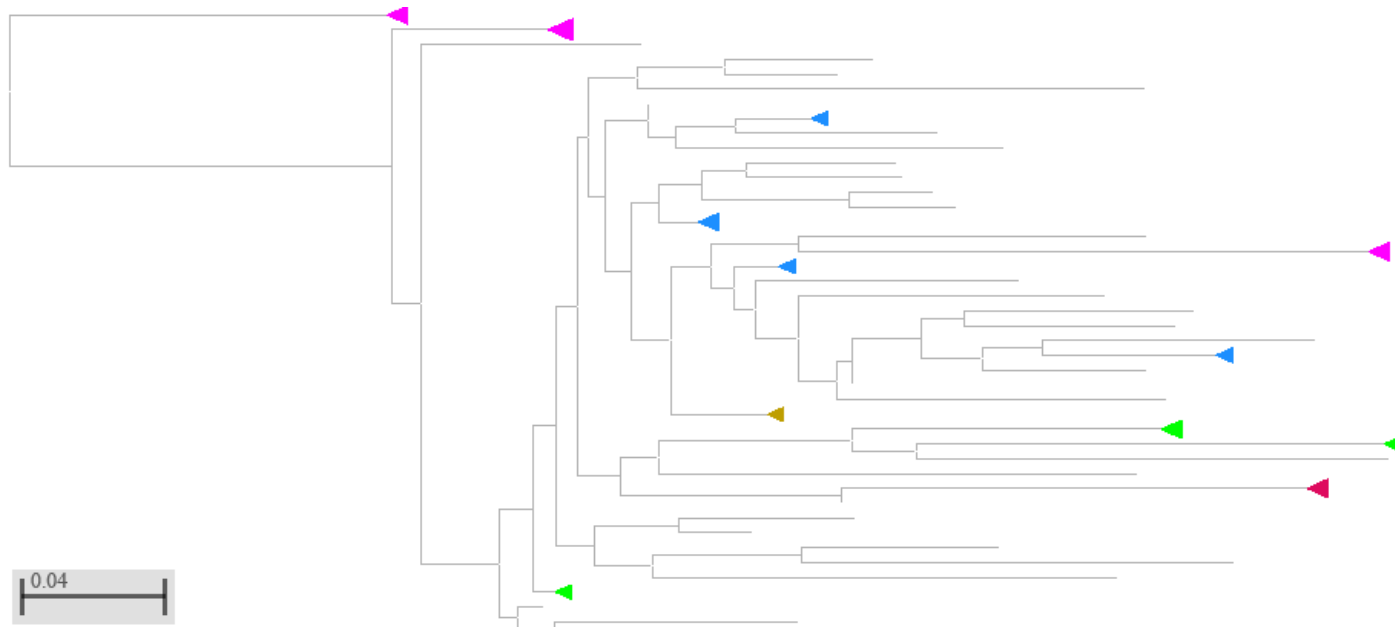




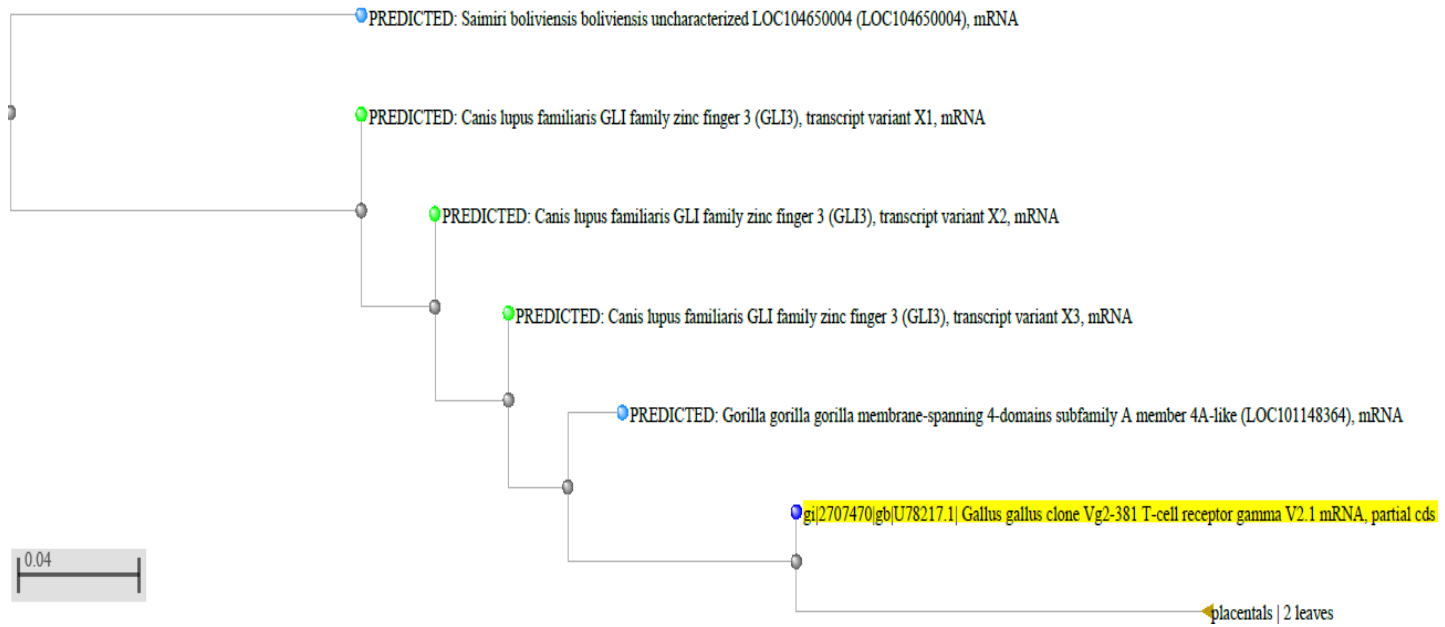
**Figure 9.** *Gallus gallus* Interleukin 12 phylogenetic tree.



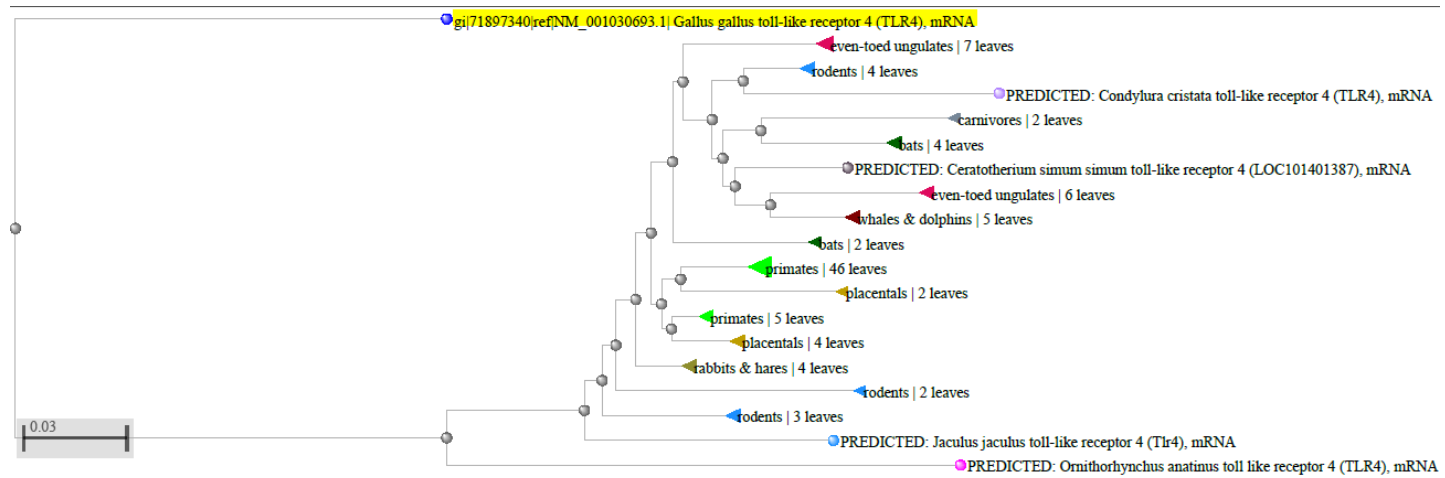
**Figure 10. *Gallus gallus* Interferon Gamma phylogenetic tree.**



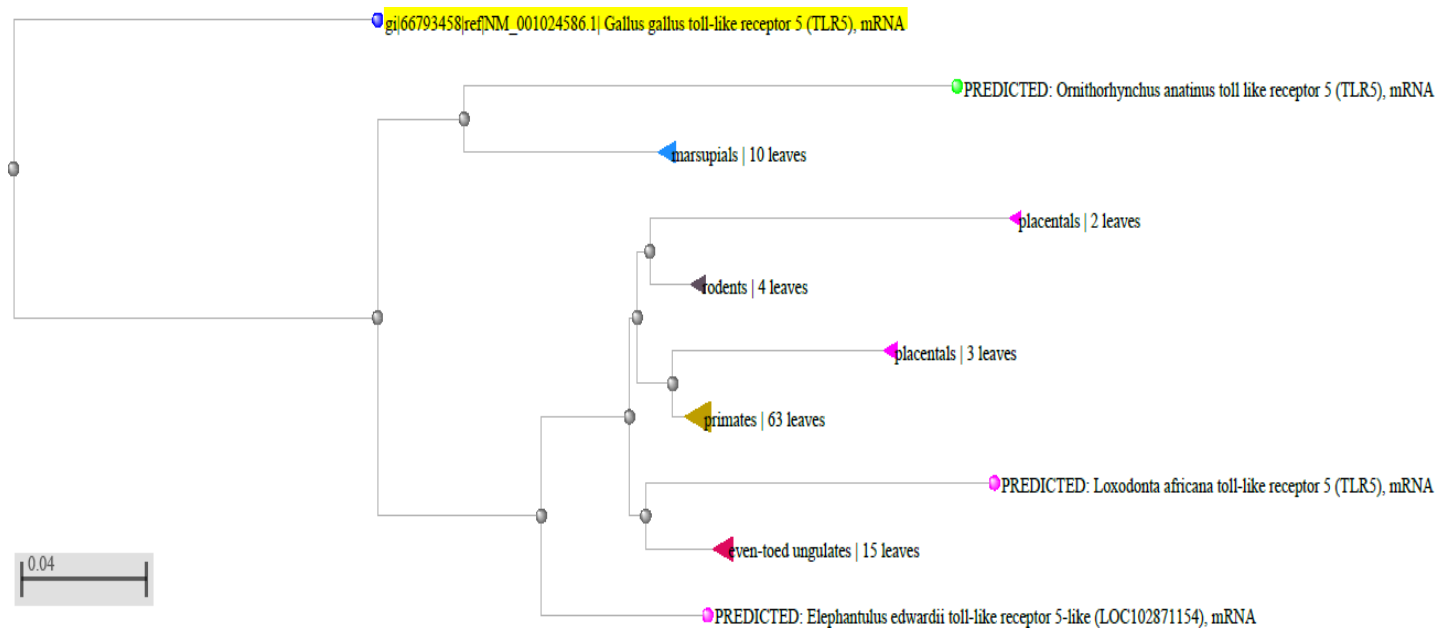
**Figure 11. *Gallus gallus* Interferon Gamma receptor phylogenetic tree.**



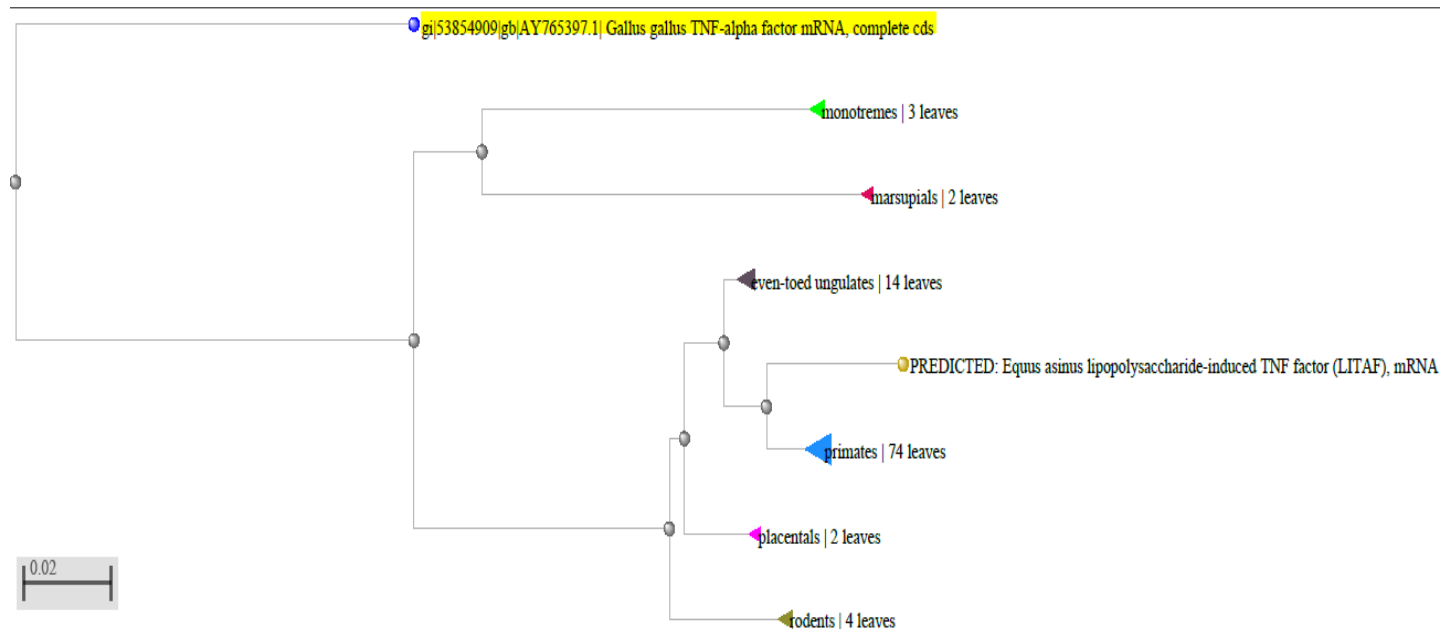
**Figure 12. *Gallus gallus* T Cell Receptor Gamma Delta phylogenetic tree.**



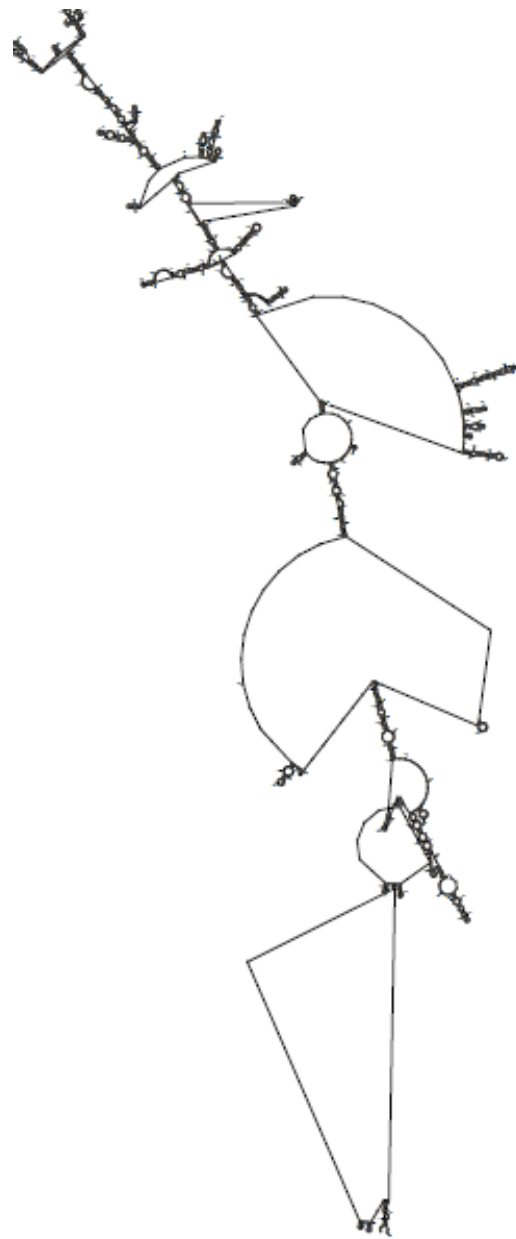
**Figure 13. *Gallus gallus* Toll Like Receptor 4 phylogenetic tree.**



**Figure 14. *Gallus gallus* Toll Like Receptor 5 phylogenetic tree.**



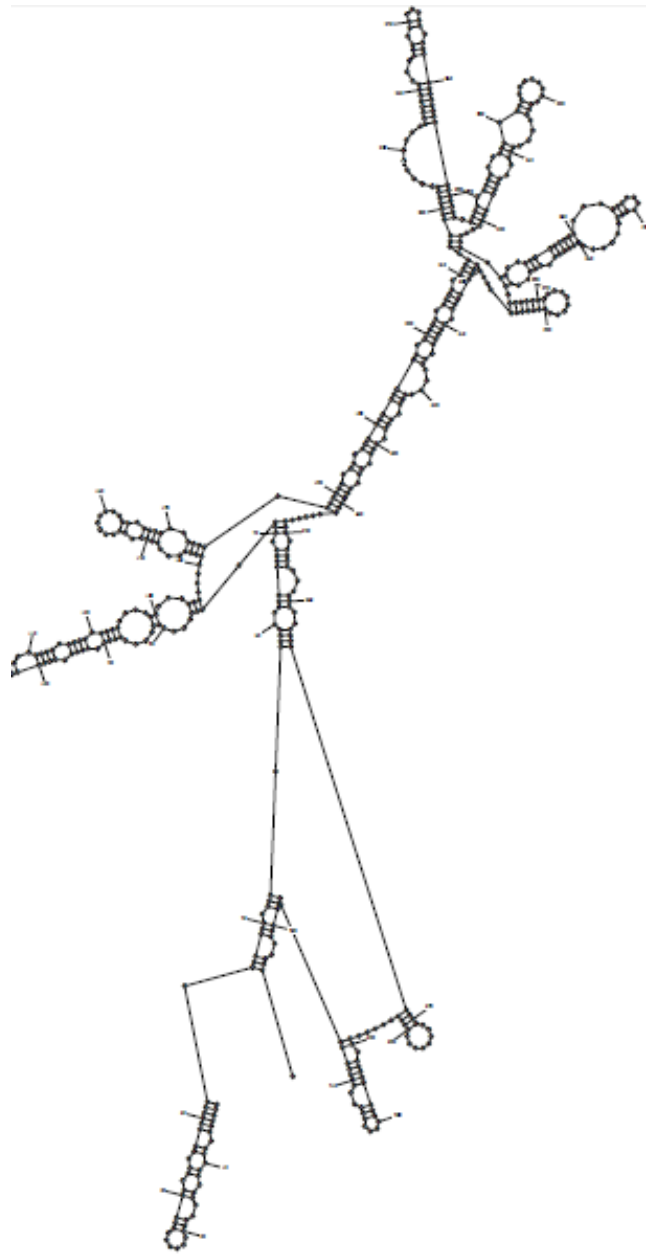
**Figure 15. Gallus gallus Tumor Necrosis Factor- Alpha phylogenetic tree.**



ENERGY = -633.7 g1|208964709|gb|FJ2..

Figure 16. *Gallus gallus* Heat Shock Protein mRNA Minimum Free Energy





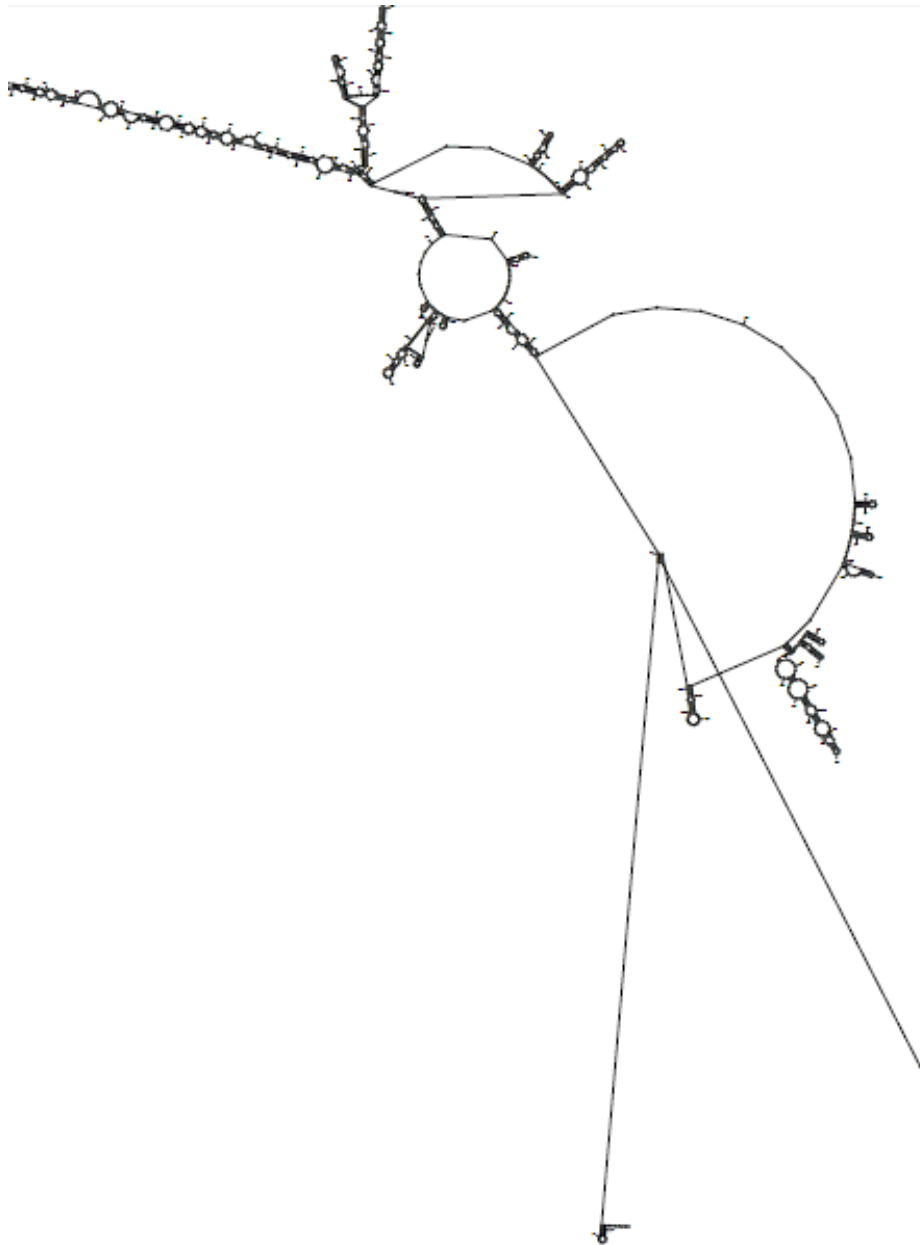
ENERGY = -175.7 ci|148540095|ref|NM..

Figure 17. *Gallus gallus* Interleukin 10 mRNA Minimum Free Energy.



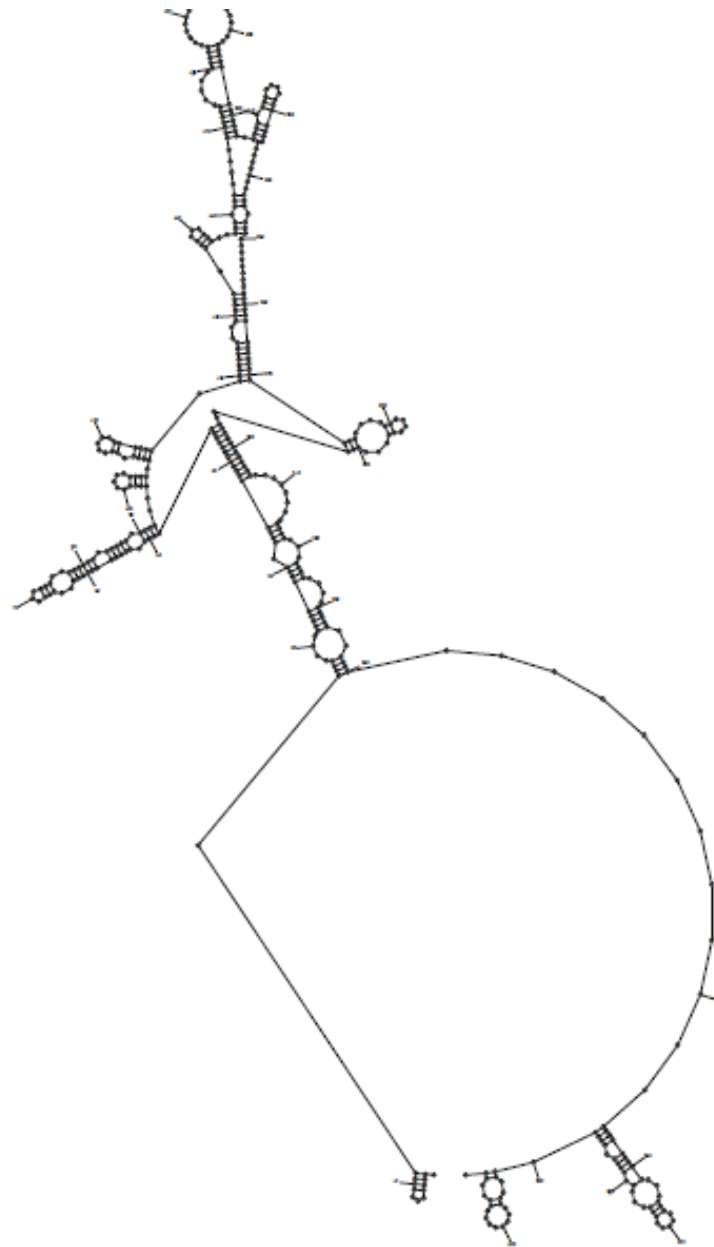
ENERGY = -533.2 gi|971376440|ref|XM...

Figure 18. *Gallus gallus* Interleukin 1 receptor mRNA Minimum Free Energy.



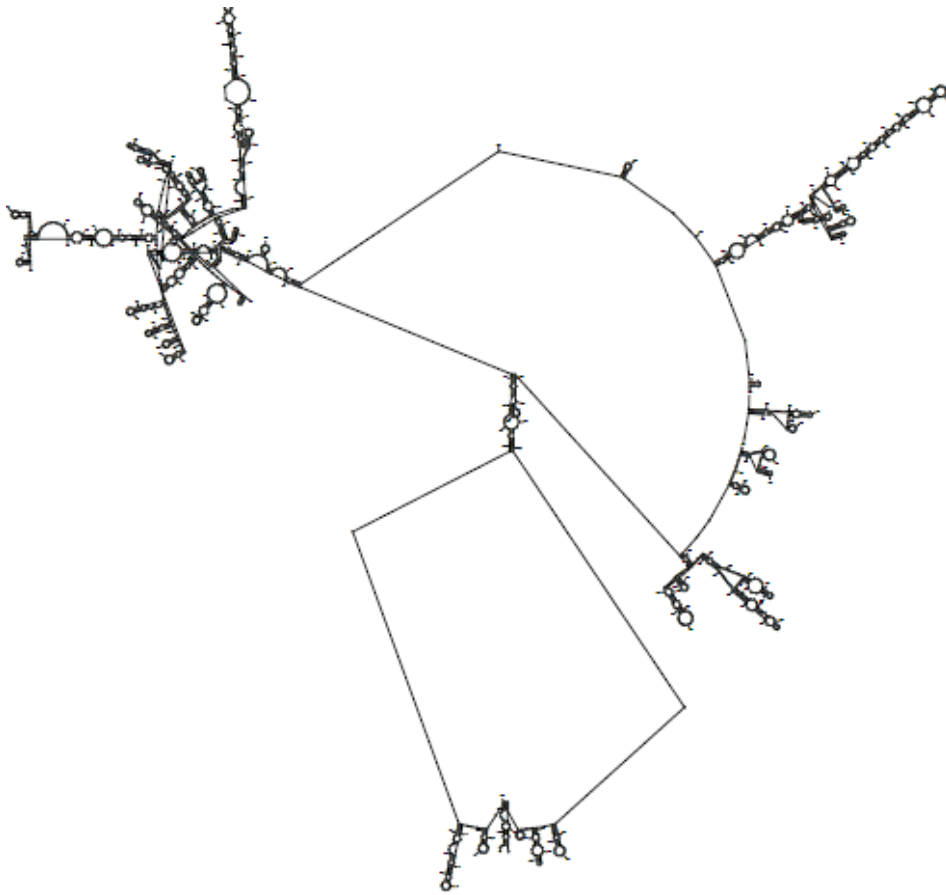
ENERGY = -431.0 gi|45433513|ref|NM\_...

Figure 19. *Gallus gallus* Interleukin 1 mRNA Minimum Free Energy.



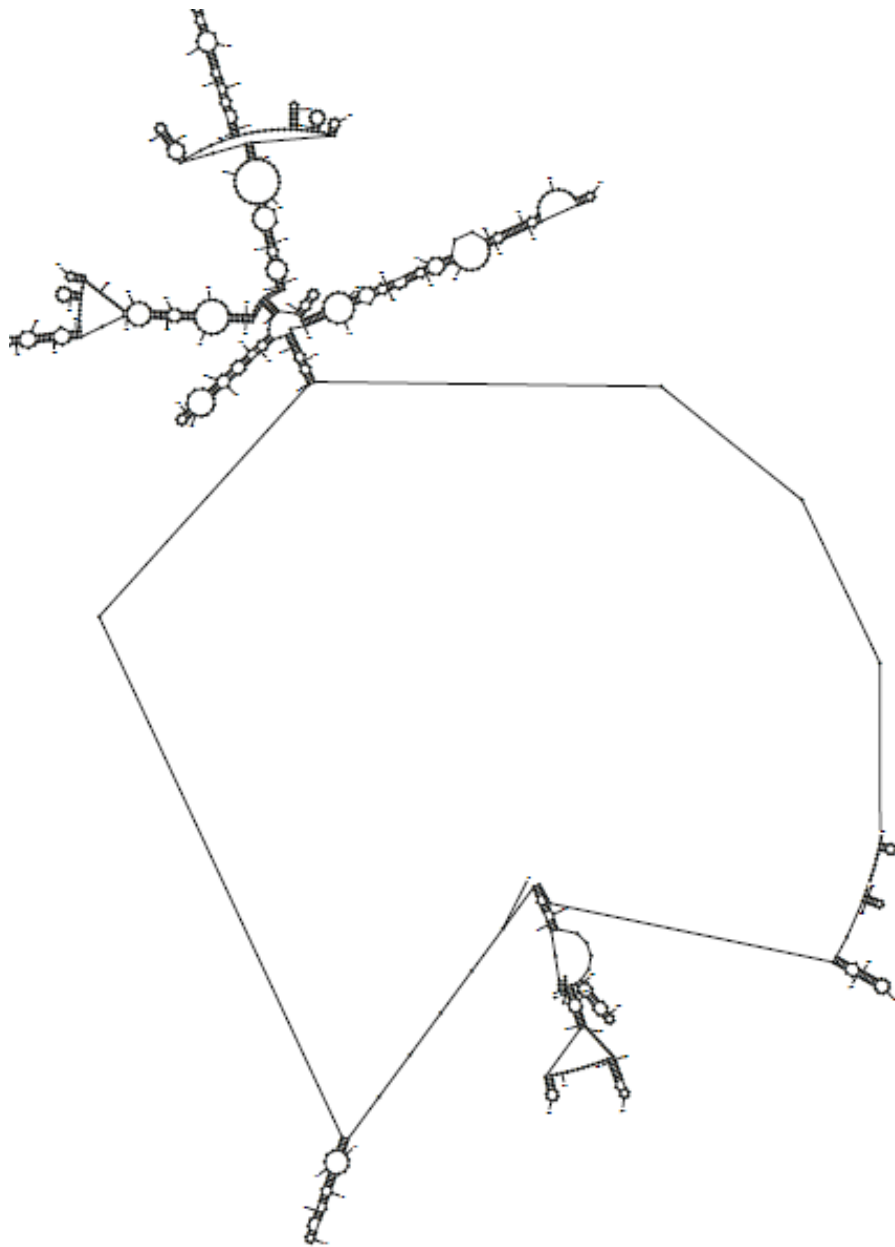
ENERGY = -126.1 gi|55741695|ref|NM ...

Figure 20. *Gallus gallus* Interleukin 4 mRNA Minimum Free Energy.



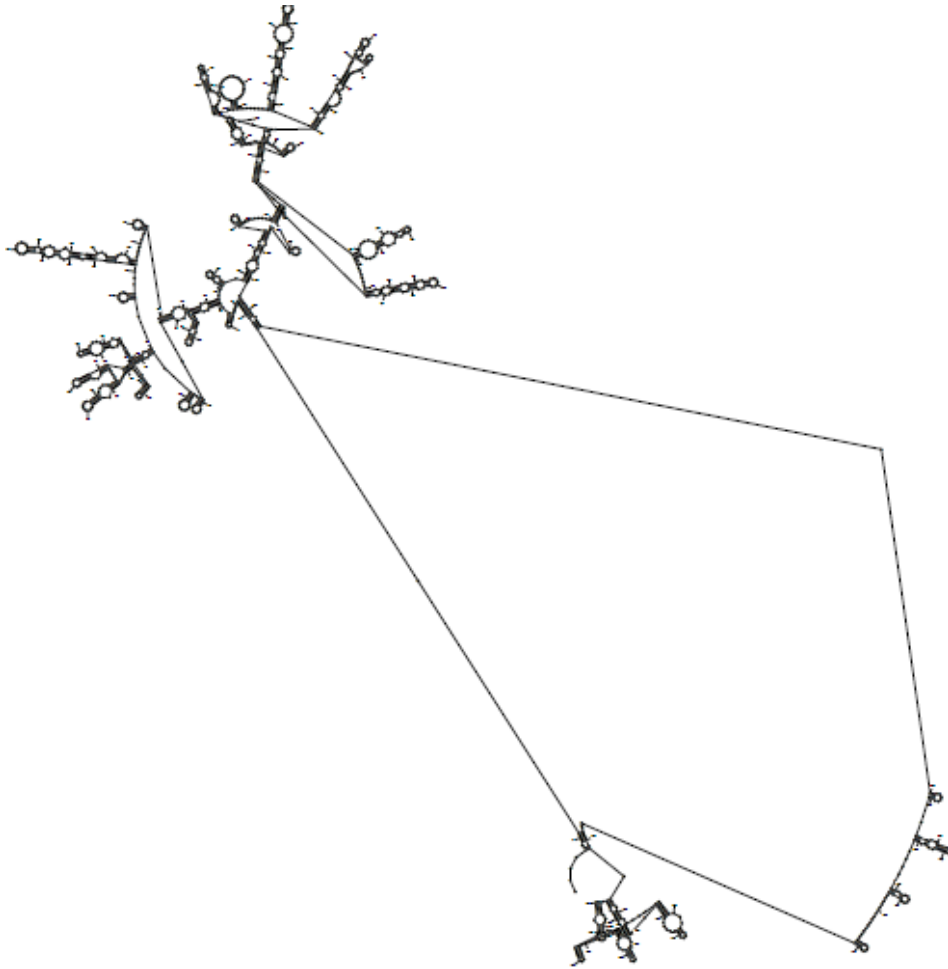
ENERGY = -872.3 gi|88853848|ref|NM ...

Figure 21. *Gallus gallus* Interleukin 10 receptor mRNA Minimum Free Energy.



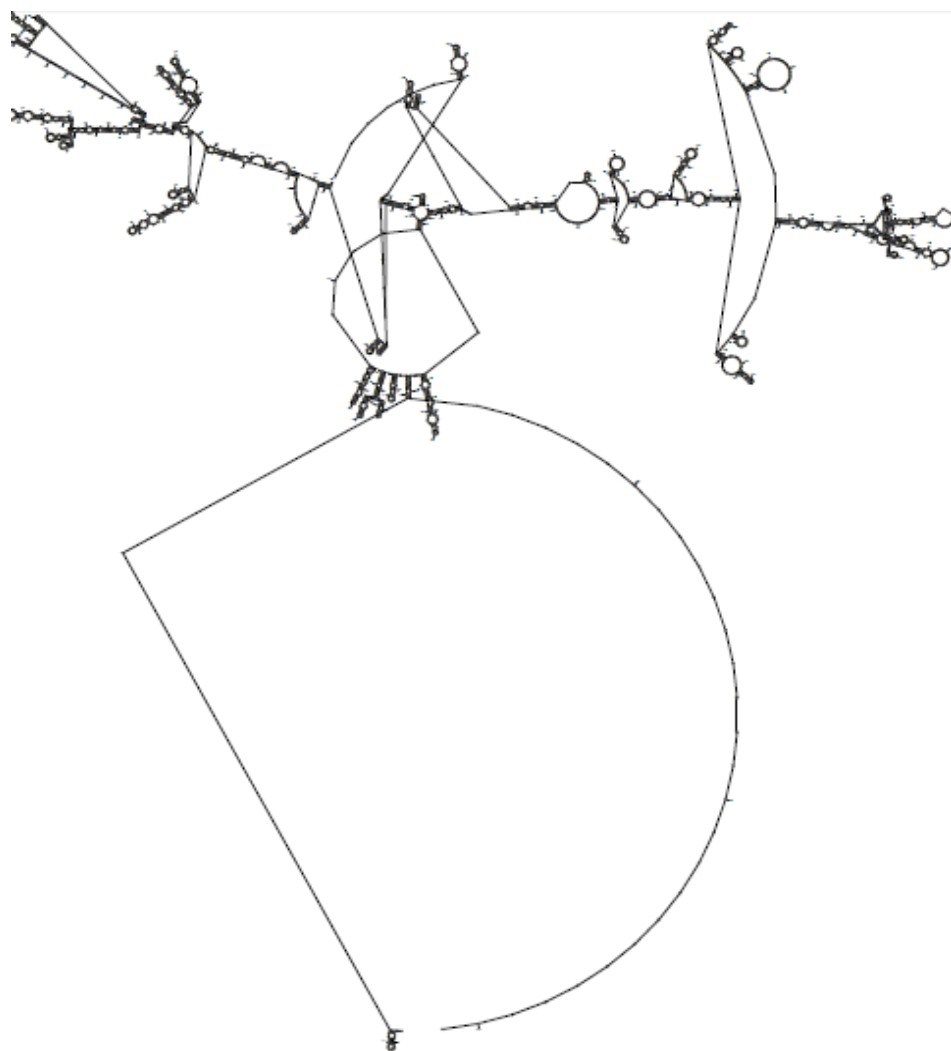
ENERGY = -248.0 gi|47087194|ref|NM\_...

Figure 22. *Gallus gallus* Interleukin 12 mRNA Minimum Free Energy.



ENERGY = -297.6 gi|45433517|ref|NM\_...

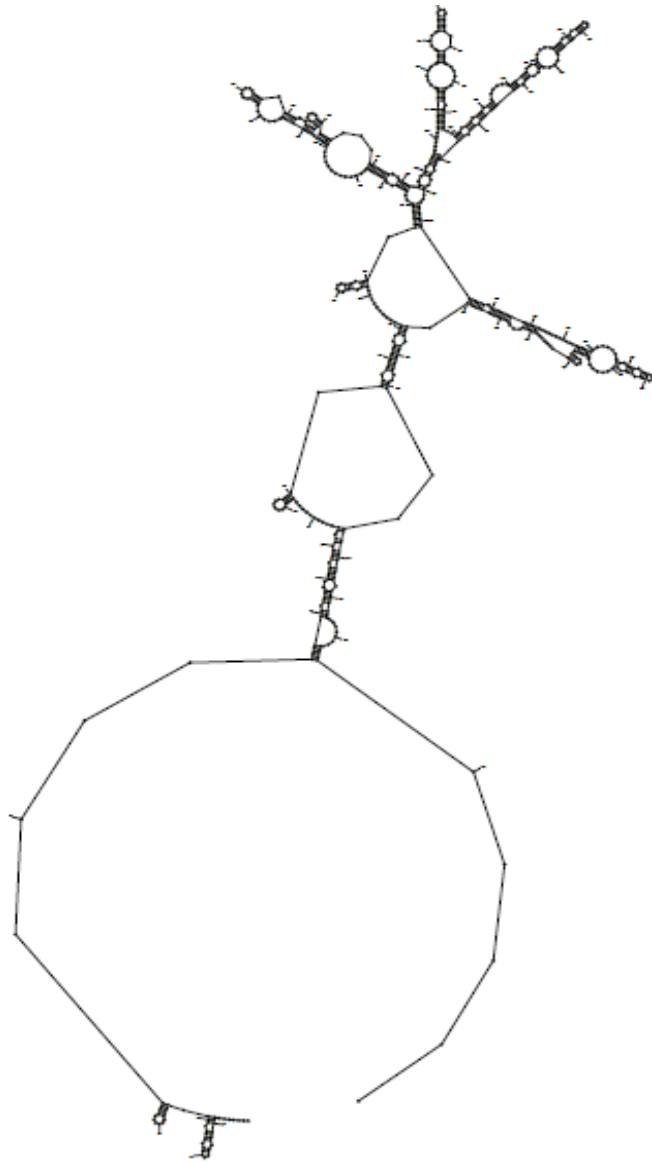
Figure 23. *Gallus gallus* Interferon Gamma mRNA Minimum Free Energy.



ENERGY = -665.2 gi|62899051|ref|NM\_...

Figure 24. *Gallus gallus* Interferon Gamma receptor mRNA Minimum Free Energy.





ENERGY = -207.8 g1|53854909|gb|AY76...

Figure 25. *Gallus gallus* Tumor Necrosis Factor- Alpha mRNA Minimum Free Energy.

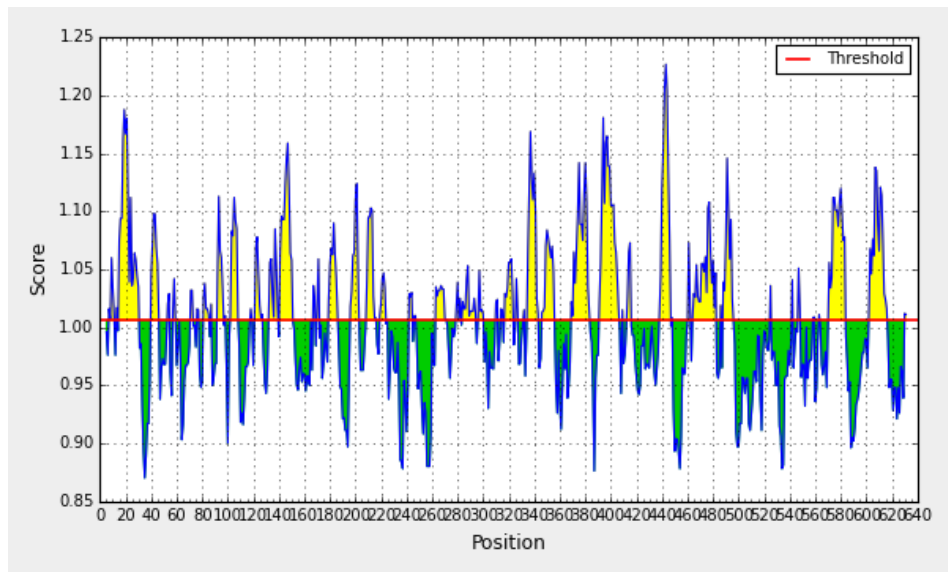


Figure 26. *Gallus gallus* Heat Shock Protein epitope antigenicity.

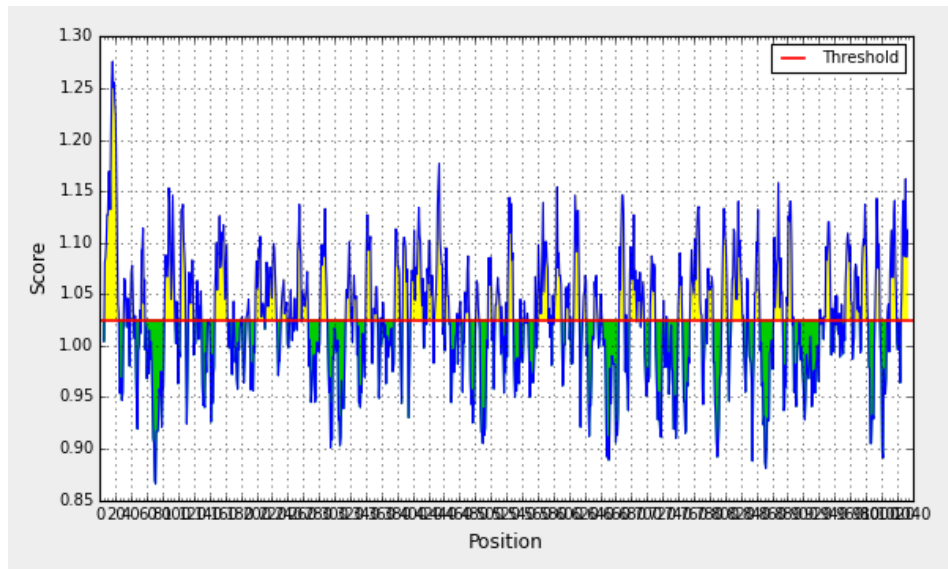


Figure 27. *Gallus gallus* Interleukin 1 receptor epitope antigenicity.

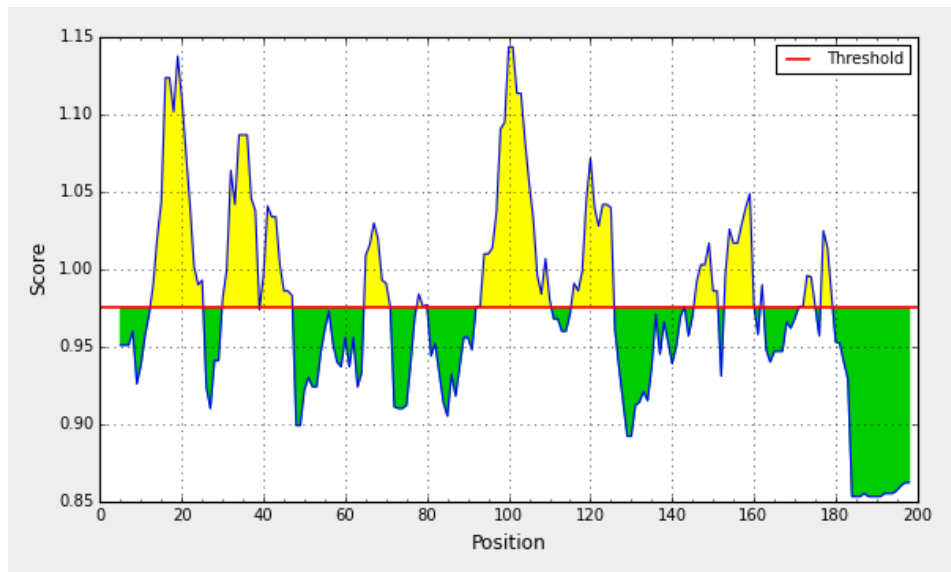


Figure 28. *Gallus gallus* Interleukin 1 epitope antigenicity.

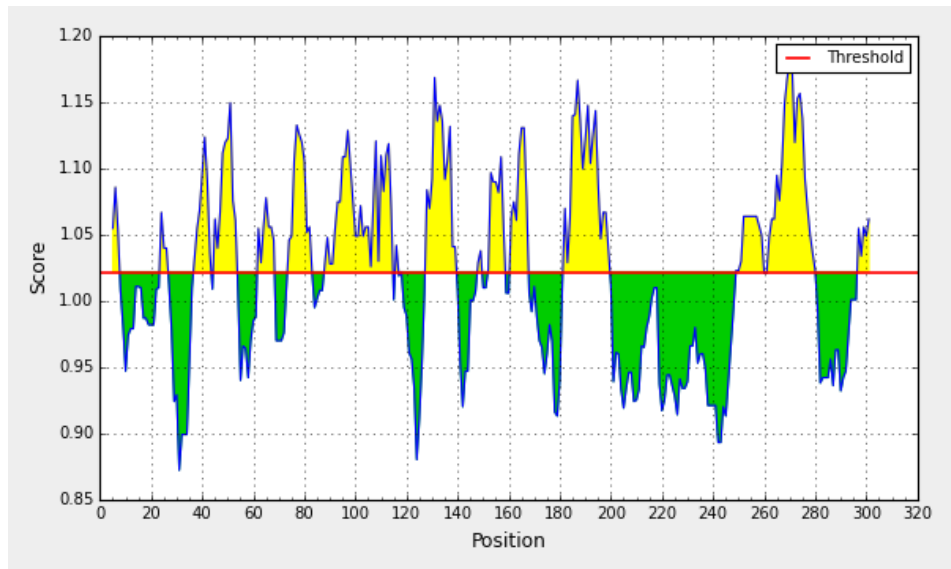
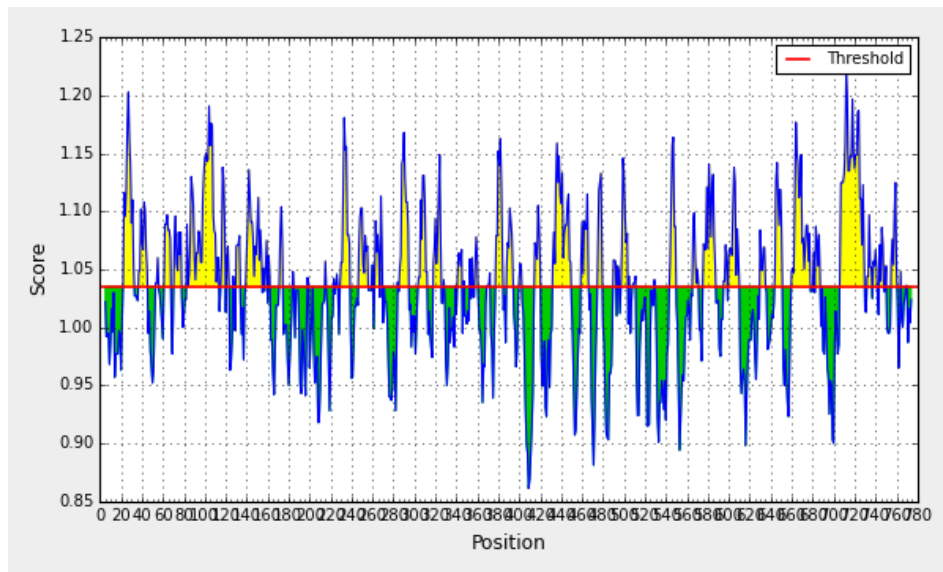
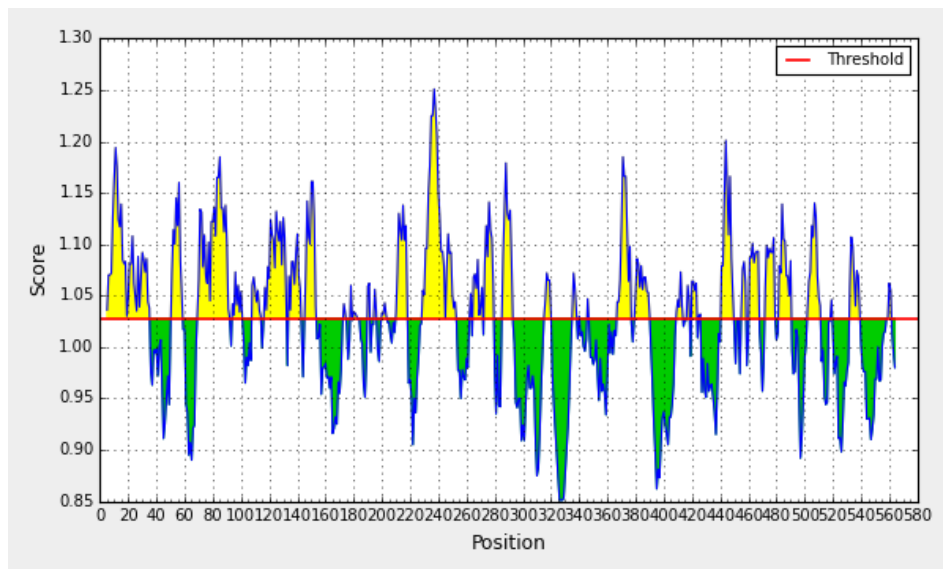


Figure 29. *Gallus gallus* Interleukin 4 receptor epitope antigenicity.



**Figure 30.** *Gallus gallus* Interleukin 4 epitope antigenicity.



**Figure 31.** *Gallus gallus* Interleukin 10 receptor epitope antigenicity.

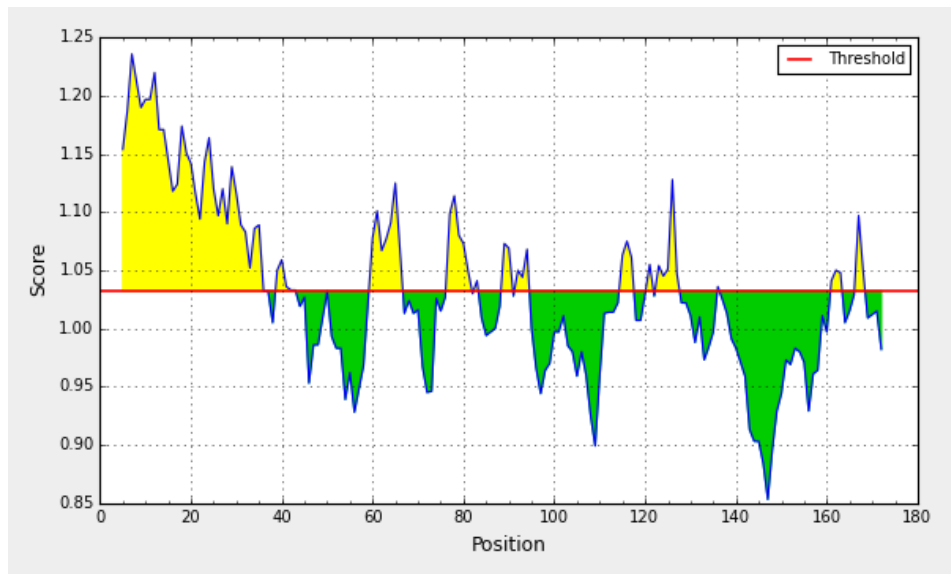


Figure 32. *Gallus gallus* Interleukin 10 epitope antigenicity.

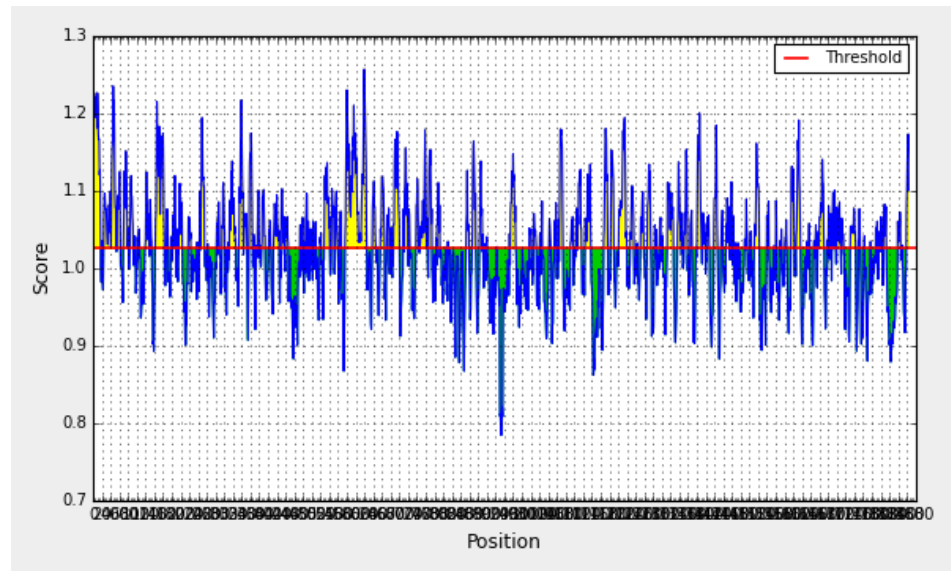


Figure 33. *Gallus gallus* Interleukin 12 receptor epitope antigenicity.

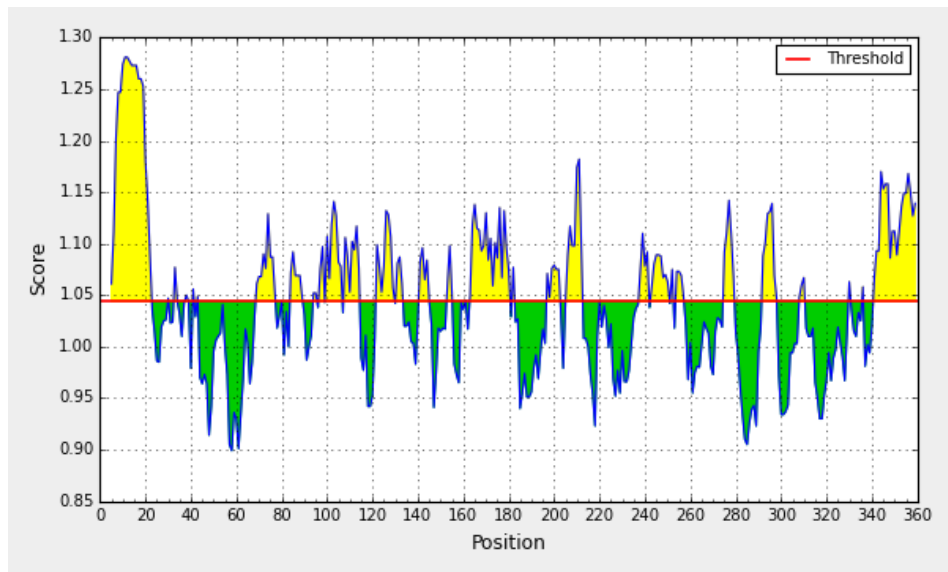


Figure 34. *Gallus gallus* Interleukin 12 epitope antigenicity.

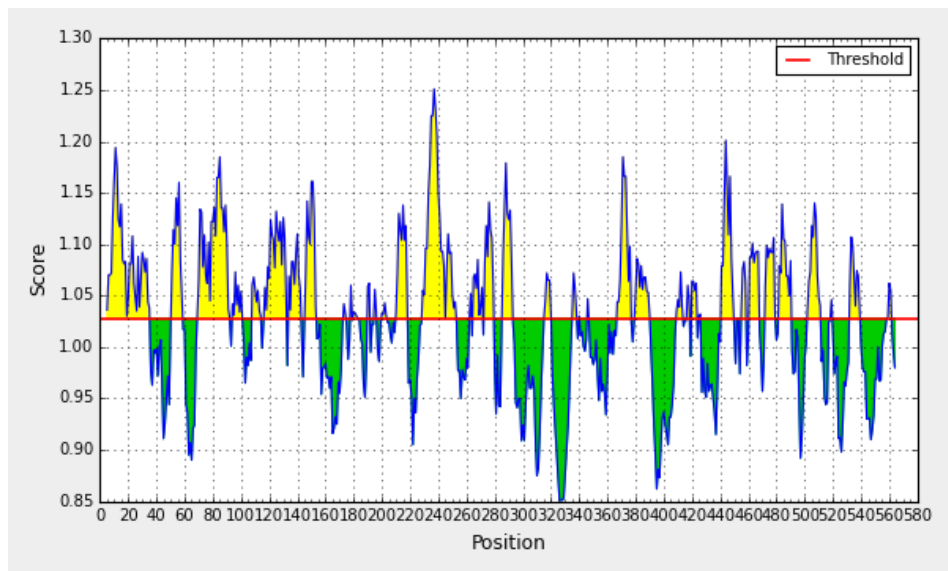
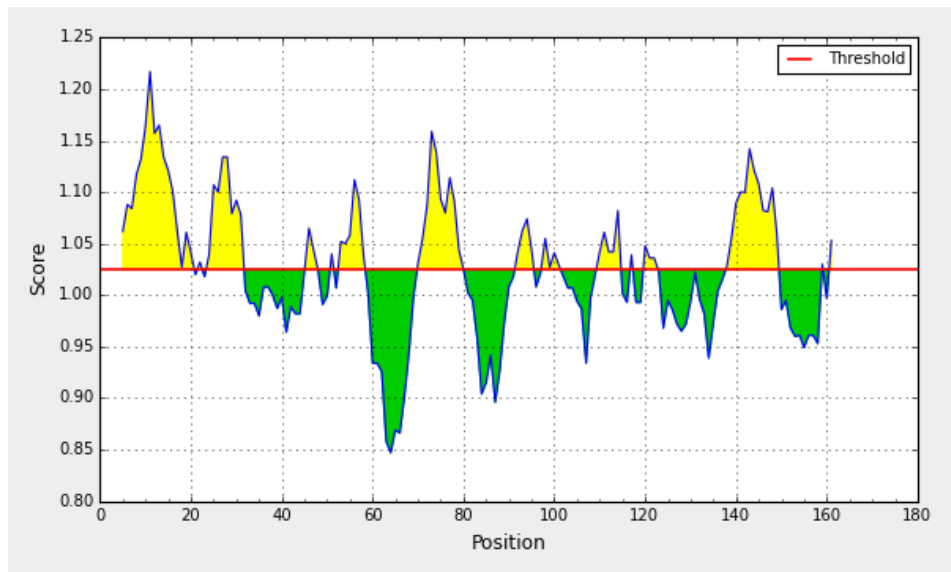
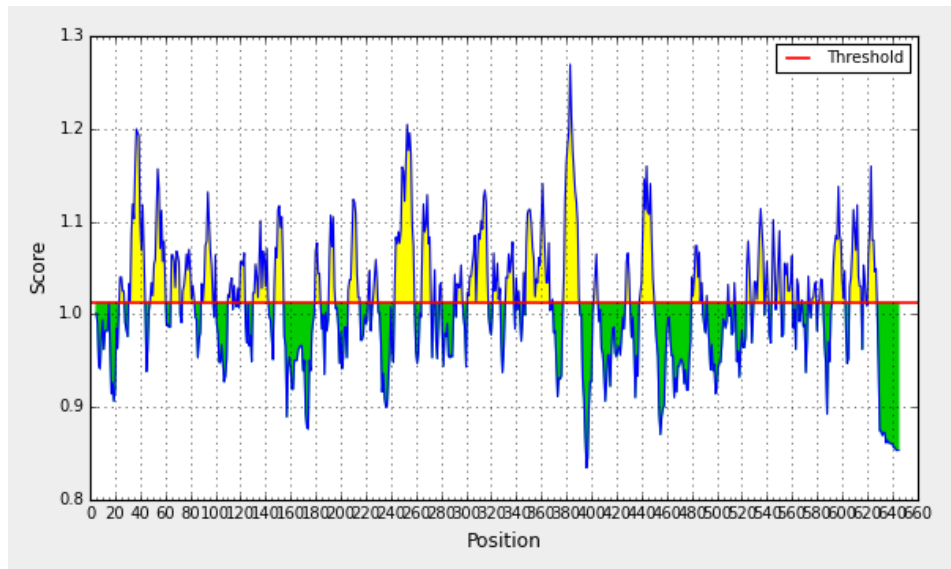


Figure 35. *Gallus gallus* Interferon Gamma receptor epitope antigenicity.



**Figure 36. *Gallus gallus* Interferon Gamma epitope antigenicity.**



**Figure 37. *Gallus gallus* T Cell Receptor Gamma Delta epitope antigenicity.**

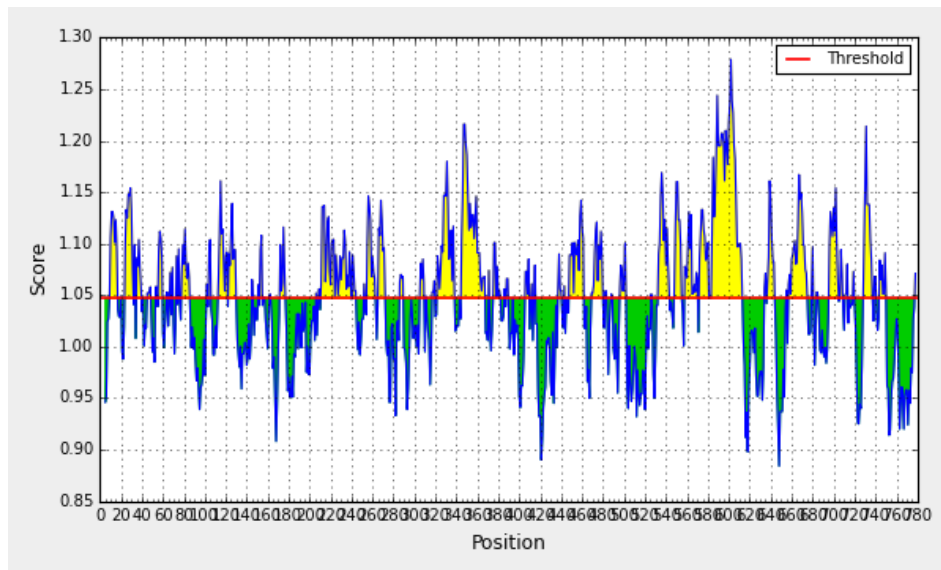


Figure 38. *Gallus gallus* Toll Like Receptor 5 epitope antigenicity.

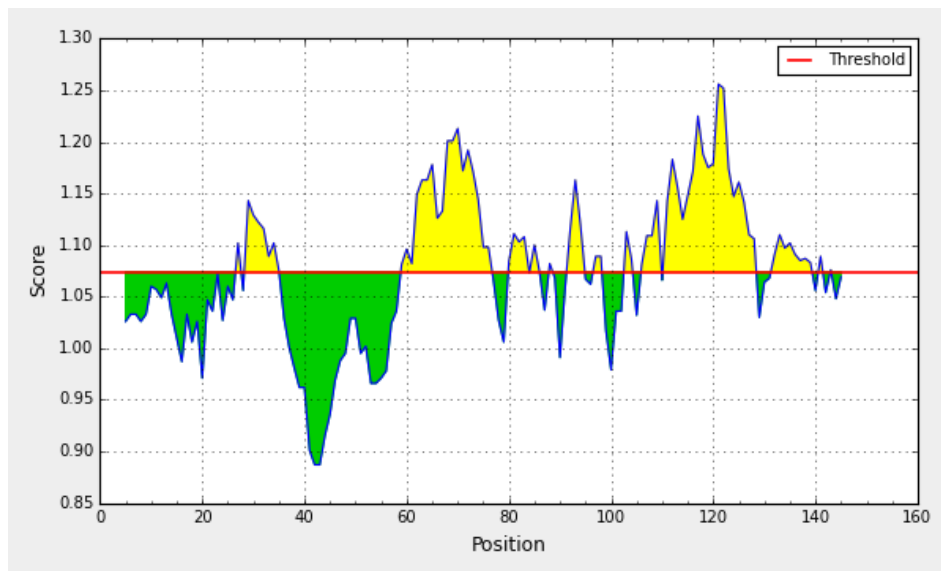
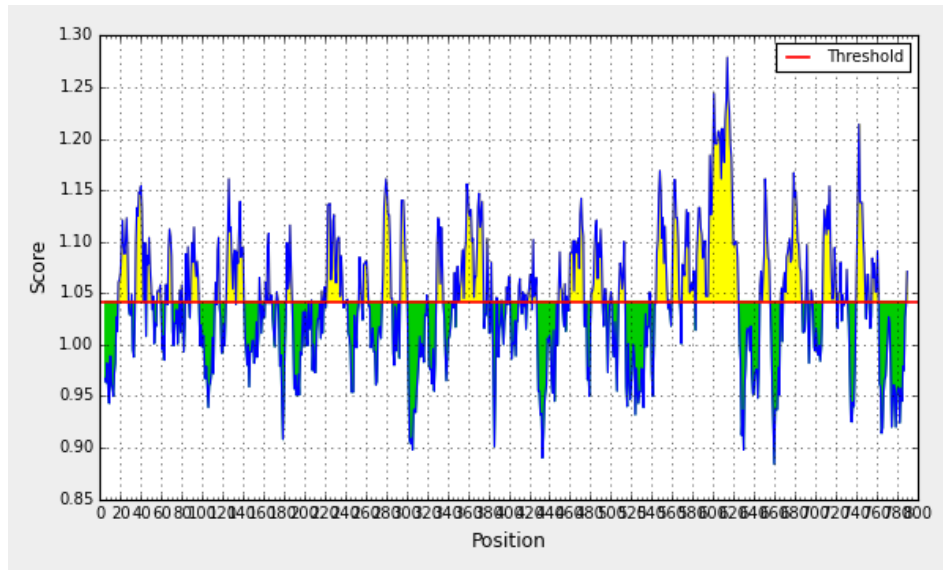


Figure 39. *Gallus gallus* Tumor Necrosis Factor- Alpha epitope antigenicity.





**Figure 40.** *Gallus gallus* Toll Loke Receptor 4 epitope antigenicity.