

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

VITOR ANDRADE COELHO MENDES

**MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMAÇÃO
INTESTINAL EM AVES UTILIZANDO VACINA VIVA
ATENUADA DE EIMERIA SPP.**

UBERLÂNDIA - MG

2021

VITOR ANDRADE COELHO MENDES

**MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMAÇÃO
INTESTINAL EM AVES UTILIZANDO VACINA VIVA
ATENUADA DE EIMERIA SPP.**

Projeto de pesquisa apresentado à
Coordenação do Curso de Graduação
em Medicina Veterinária da
Universidade Federal de Uberlândia,
como requisito à aprovação na
disciplina de Trabalho de Conclusão de
Curso II.

Orientadora: Profa. Dra Belchiolina
Beatriz Fonseca

UBERLÂNDIA

2021

MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMAÇÃO INTESTINAL EM AVES UTILIZANDO VACINA VIVA ATENUADA DE EIMERIA SPP.

Trabalho apresentado à banca examinadora, como requisito à aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II da graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Belchiolina Beatriz Fonseca

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a Belchiolina Beatriz Fonseca
Universidade Federal de Uberlândia

Prof. Dr. Fernando Cristino Barbosa
Universidade Federal de Uberlândia

Msc. Paula Fernanda de Sousa Braga
Universidade Federal de Uberlândia

UBERLÂNDIA-MG

2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Priscilla e Odemir, que sempre fizeram o possível e o impossível para me proporcionar tudo que precisei. Nunca medindo esforços para me ajudar nessa caminhada que é a vida.

Agradeço aos meus avós, Osvaldo, Orlandina, Vera e Luís. Infelizmente nem todos estão mais presentes nesse plano, mas sei que estão olhando por mim lá de cima e que vovó Orlandina que está aqui torce muito por mim.

Agradeço a minha família, irmã, primos e tios que sempre estiveram torcendo por mim e me apoiando.

Agradeço meu velhos amigos que me acompanham desde a infância, meus amigos que a faculdade me deu da turma 81, e também amigas que a reprovação me deu. Sou muito grato por ter vivido cada dificuldade e alegrias com vocês.

Agradeço a minha orientadora Bia, que me deu oportunidade de aprender mais com ela, que me ajudou a enxegar a avicultura de forma diferente e que nesse cenário atual com a pandemia teve paciência pra me ajudar a terminar esse trabalho, que não é fácil pessoalmente e de forma remota então se mostrou bem mais desafiante.

Agradeço também a todos os professores da graduação, que de alguma forma passaram aprendizados e ensinamentos que foram fundamentais para meu crescimento pessoal e profissional. Sou muito realizado por ser UFU.

RESUMO

Coccidiose é uma doença causada pela *Eimeria spp.*, um parasito intracelular obrigatório que leva a destruição das células epiteliais intestinais. Essa destruição de células acarreta na redução de ganho de peso e prejudica a conversão alimentar. O uso de cepas vacinais virulentas em altas dosagens pode ser uma alternativa para estudos de inflamação intestinal e a doença clínica. Porém pouco se sabe sobre o uso de cepas vacinais atenuadas para estudos com inflamação ou quebra de barreira intestinal. Assim o objetivo desse trabalho foi avaliar a possibilidade de uma vacina atenuada levar a forma clínica da doença em aves. Foram utilizados machos descartes de poedeira comercial da linhagem Hy-line alojados com 1 dia de idade no Laboratório de Ornitopatologia e Pesquisas Avícolas da Universidade Federal de Uberlândia. As aves foram alojadas no chão com cama de maravalha com temperatura ambiental de 32^oC, água e ração a vontade. As aves foram desafiadas com 0,30 ml (10 vezes a dose indicada) de uma vacina viva atenuada para coccidiose aviária aos 15 dias de idade. As aves foram observadas nos períodos subsequentes diariamente, a cada 4 dias após a inoculação e foram coletadas 3 amostras de fezes de cama para contagem dos oocistos. Após observação da presença de sintomas clínicos, as aves foram eutanasiadas para avaliação da integridade intestinal nas idades de 22 dias e 31 dias. A vacina levou a alterações no tamanho intestinal, lesões no intestino das aves e apresentação de oocistos na cama.

Palavras-chave: lesão, coccidiose, desafio.

ABSTRACT

Coccidiosis is a disease caused by *Eimeria* spp., an obligate intracellular parasite that destroys intestinal epithelial cells. This cell destruction leads to reduced weight gain and impairs feed conversion. Virulent vaccine strains at high doses may be an alternative for studying intestinal inflammation and clinical disease. However, little is known about the use of attenuated vaccine strains for studies on inflammation or breaking the intestinal barrier. Thus, this work aimed to evaluate the possibility that an attenuated vaccine could lead to the clinical form of the disease in birds. Males from commercial laying hens of the Hy-line lineage were housed one day old at the Laboratory of Ornithopathology and Poultry Research of the Federal University of Uberlândia were used. The birds were housed on the floor with wood shavings litter at an environmental temperature of 32°C, water and feed ad libitum. Birds were challenged with 0.30 ml (10 times higher than the indicated dose) of the live attenuated vaccine for avian coccidiosis at 15 days old. The birds were daily observed in subsequent periods daily, every 4 days after inoculation and 3 samples of from the litter were collected for oocysts counting. After observing the presence of clinical symptoms, birds were euthanized to assess intestinal integrity at 22 and 31 days old. The vaccine led to changes in intestinal size, lesions in the portions of birds' intestines, and presentation of oocysts in the litter.

Keywords: Lesion, coccidiosis, challenge.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVO	9
3 REVISÃO DE LITERATURA	10
4 MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.2 Avaliação da Sintomatologia Clínica e Características das Fezes	14
4.3 Avaliação da Bolsa de Fabricius e Timo	14
4.4 Avaliação da Integridade Intestinal	14
4.5 Morfometria	15
4.6 Análise Estatística	15
5 RESULTADOS	16
6 DISCUSSÃO	19
7 CONCLUSÕES	21
8 REFERÊNCIAS	22

1 INTRODUÇÃO

A coccidiose aviária, causada pela infecção com os protozoários do gênero *Eimeria*, leva a perdas econômicas significativas na indústria avícola. Estes são parasitos intracelulares de enterócitos que, ao final de seu desenvolvimento e reprodução, rompe a célula hospedeira, interferindo na absorção de nutrientes, com consequente redução do ganho de peso e aumento da conversão alimentar (COSTA, 2002; KINNAIRD et al., 2004; CACHO et al., 2004).

A medida que a população global de aves continua a crescer, aliado aos custos com as profilaxias e tratamentos, que visam diminuir os impactos que a doença causa no ganho de peso, resultam em grandes gastos para o produtor (BLAKE, KNOX et al. 2020). O uso de drogas para o controle tem se mostrado eficaz. Porém a utilização delas em longos períodos tem se mostrado um problema, com o surgimento de cepas resistentes (QUIROZ-CASTAÑEDA AND DANTÁN-GONZÁLEZ, 2015).

Nos últimos anos, a tendência ao emprego de vacinas na prevenção desta enfermidade aumentou devido ao receio quanto aos resíduos das drogas na alimentação e alto custo das investigações com novas drogas (COSTA, 2002). Vacinas contendo cepas virulentas foram as primeiras utilizadas. Notou-se que o uso em um sub-dose dessas cepas concedia imunidade protetora frente a um próximo desafio. Atualmente essas vacinas são utilizadas de várias formas e por diferentes veículos como: água de bebida, em gel, por spray, entre outros. Há diferentes formas de modular a patogenicidade das cepas, seja por meio da passagem em ovo embrionado, coadministração com anticoccídicos em baixas doses (LILLEHOJ et al., 2000a). Atualmente muitas vacinas vivas que são utilizadas no controle da coccidiose são as atenuadas. O benefício das vacinas atenuadas em comparação com as cepas virulentas é que elas possuem menor possibilidade de lesão intestinal, por seu menor potencial reprodutivo e, simultaneamente, conferindo maior imunidade aos animais (TOMASI, 2006).

O intestino tem como função primária a absorção de nutrientes e água provenientes da alimentação, dentre outras moléculas, e posteriormente realizar a excreção do bolo fecal. O processo de absorção ocorre na presença de ampla

variedade de antígenos, provenientes dos alimentos, e da microbiota, sem que haja a quebra da integridade da barreira intestinal. A quebra da barreira intestinal pode resultar no desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais, privação de nutrientes, dentre outras patologias (CHIKINA, et al., 2020).

Uma das formas do estudo da quebra de barreira intestinal e inflamação é a inoculação de uma ou várias cepas de *Eimeria* nas aves. No entanto, há uma dificuldade de se encontrar no mercado tais cepas comerciais para serem estudadas a não ser em vacinas vivas com cepas virulentas. Porém com o aumento de vacinas vivas atenuadas no mercado é importante avaliar se essas vacinas são alternativas em estudos com quebra de barreira intestinal e inflamação.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Gerais

O objetivo desse estudo foi avaliar se cepas vacinais atenuadas de *Eimeria* spp. provocam inflamação intestinal em aves.

2.2 Objetivo Específico

Avaliar um modelo de coccidiose clínica ou subclínica para pesquisas de quebra de barreira intestinal para estudos futuros com esse parasita utilizando cepas vacinais atenuadas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Coccidiose aviária é uma parasitose intestinal que atinge diversas espécies de aves, sendo o agente causador a *Eimeria*, responsável por quadros de diarreia, perda de peso, elevada conversão alimentar, e quando severo alta taxa de mortalidade (YIN et al., 2011). A *Eimeria* pertence ao filo apicomplexa, e as várias espécies dela infectam vários hospedeiros diferentes, como o pato, peru, coelho, bovino, ovino, frango, entre outros (BLAKE 2015). Em específico no frango foi relatado sete espécies, que são elas: *E. tenella*, *E. máxima*, *E. mitis*, *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. praecox* e *E. necatrix*. Cada uma delas possui uma região específica do intestino que vai acometer e também um diferente nível de lesão que vai causar (MORRIS et al., 2007). Uma das mais patogênicas das sete que infectam galinhas é a *E. tenella* que invade a mucosa cecal causando inflamação e danos aos enterócitos (MIN et al., 2004).

O ciclo de vida pode ser dividido em três fases: Esporogonia, processo de esporulação dos oocistos que ocorre no ambiente, merogonia (esquizogonia) e gametogonia, que ocorre no organismo do hospedeiro (LILLEHOJ et al., 2000a). As aves infectam-se pela ingestão dos oocistos viáveis e esporulados presentes na cama, água, alimento ou no solo. Uma vez ingeridos, rompem-se sob a ação mecânica da moela e enzimática da quimiotripsina e sais biliares, liberando os esporozoítos. Estes infectam as células da mucosa intestinal, os enterócitos. No interior dos enterócitos o esporozoíto passa por sucessivas divisões até a formação do meronte (esquizonte). O meronte após sua maturação rompe a célula liberando os merozoítos que invadem outras células repetindo o processo por 2 a 4 gerações, esse processo varia de acordo com a espécie. Em seguida os merozoítos invadem novas células e se diferenciam em micro e macrogametócitos, os quais irão se unir e formar o zigoto que irá virar o oocisto, que é liberado no meio ambiente junto com as fezes. Sob condições ótimas de umidade, temperatura e oxigênio este oocisto irá esporular tornando-se infectante (KINNAIRD et al., 2004; CACHO et al., 2004).

Vacinas vivas de baixa dose e atenuadas conferem imunidade protetora, pois permitem o desenvolvimento completo do ciclo do parasito e isso gera um estímulo a todas as vias da resposta imune, particularmente a resposta imune

celular, a qual promove de fato uma proteção contra infecções subsequentes. Por outro lado, as vacinas recombinantes irão depender da proteína utilizada, sendo esta de forma preferencial participante das etapas fundamentais no ciclo do parasito (LILLEHOJ et al., 2000a).

As vacinas vivas tem a vantagem de possuir uma baixa chance de lesão intestinal, pelo seu menor potencial reprodutivo, e conferir maior imunidade aos animais (TOMASI, 2006). No entanto, as vacinas vivas possuem problemas, um deles seria a reversão da atenuação, e o outro problema está relacionado com o mecanismo de infecção e o desenvolvimento da imunidade. Para que ocorra o desenvolvimento da imunidade protetora nas aves, o esporozoítio precisa invadir as células e realizar seu ciclo celular, assim acontecerá o estímulo do sistema imune celular (efetivamente protetor). Esse estímulo acontece tanto nas infecções naturais quanto nas vacinas atenuadas. O uso de coccidiostáticos é contraindicado quando se utiliza este tipo de vacina, já que eles impedem o desenvolvimento do parasito, interferindo no desenvolvimento da imunidade (MARTINS, 2012). As vacinas vivas podem não conter número suficiente de espécies mais patogênicas para induzir imunidade protetora, com isso utiliza-se o manejo de autoinfecção de parasitos reciclados (JUNIOR, 2000).

Vacinas inativadas são produzidas com organismos inativados ou mortos e, ou antígenos de superfície (LILLEHOJ et al., 2000a). A utilização de uma vacina com subunidades de esporozoítos administrada por via nasal, demonstra uma diminuição nos escores de lesão, eliminação de oocistos e lesão tecidual (GARCIA et al, 2008).

Para a produção de vacinas com DNA recombinantes deve-se utilizar um veículo que pode ser um vetor vivo, um DNA recombinante, ou até uma proteína expressa e purificada (SHIRLEY et al, 2007). Vacinas de DNA possuem genes que codificam proteínas imunogênicas de patógenos. Elas então são utilizadas em união com elementos regulatórios apropriados, como os promotores e os estimuladores, assim possibilitando que a proteína codificada seja expressa, então sendo reconhecida pelo sistema imune do hospedeiro de uma forma que simule uma infecção natural. Essa vacina requer transferência de genes e expressão do antígeno em tecidos acessíveis ao sistema imune, como músculo, mucosas e pele (LILLEHOJ et al., 2000a). Em trabalhos recentes com infecção

experimental por *E. tenella* imunizadas com uma proteína (cSZ-2) de *E. acervulina*, notou-se uma significativa diminuição em lesões intestinais, perda de peso e eliminação de oocistos (LI et al, 2010). Porém para efetividade dessa vacina deve se levar em consideração a escolha das proteínas. Para definir a escolha da proteína deve-se levar em conta a imunogenicidade do produto recombinante, e também se há tecnologia para produção em larga escala (FERNÁNDEZ-ROBLEDO et al., 2010).

A inflamação é o estímulo imediato após algum dano no tecido ou célula, podendo ser causado por patógeno, produto químico ou até lesão física. Ela pode ser dividida em aguda ou crônica, sendo a aguda uma resposta de prazo mais curto, normalmente levando a cura da lesão, enquanto a crônica tem uma resposta desregulada com um prazo maior, tornando a inflamação persistente (WEISS, 2008). O papel da inflamação é muito importante para sobrevivência, pois ela tenta manter a homeostase da região afetada, causando uma baixa atividade da região inflamada como custo desse processo (MEDZHITOV, 2010). Em aves o processo inflamatório se mostrou capaz de reduzir a vulnerabilidade de importantes patógenos, porém a inflamação também pode causar danos nos tecidos levando a uma perda na produtividade do animal (BROOM AND KOGUT, 2018).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados machos de poedeira comercial da linhagem Hy-line alojados com 1 dia de idade no Laboratório de Ornitopatologia e Pesquisas Avícolas da Universidade Federal de Uberlândia. As aves ficaram alojadas no chão com cama de maravalha com temperatura ambiental inicial de 32^oC sendo adequada diariamente de acordo com a idade das aves, recebendo água e ração a vontade. Aos 9 dias de idade foi coletado 10 gramas de fezes da cama para contagem dos oocistos.

Aos 15 dias de idade as aves foram divididas em dois grupos cada um contendo 8 aves sendo um grupo o controle negativo e o outro grupo desafiado com uma dose de 0,3ml via gavagem, da vacina Bio-coccivet R para coccidiose aviária contendo as cepas: *Eimeria tenella*, *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. necatrix*. A dosagem dada para cada ave foi de 10 vezes a dose preconizada da vacinação. As aves foram observadas diariamente, a partir do dia pós inoculação, quanto ao aparecimento de manifestações clínicas, sintomatologia e característica das fezes. No sexto dia após a inoculação foram coletadas 3 amostras de fezes frescas de cama para contagem dos oocistos. No nono dia após a inoculação foi feito o desafio com a mesma dosagem do primeiro desafio, devido à falta de sintomatologia. No décimo dia após a inoculação foi feita mais uma coleta de fezes e no décimo quarto dia após a inoculação foi feita a última coleta de fezes. Após, esse período as aves com 31 dias de idade foram eutanasiadas com superdosagem de quetamina, xilazina e tiopental (aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais sob o número 057/18).

4.1 Contagem dos Oocistos

Foi utilizada a técnica do OoPG (oocistos por grama) para mensurar o número de oocistos por grama de fezes dos animais. Para isso foi colocado 4g de fezes em um frasco e acrescentado 26ml de solução hipersaturada de cloreto de sódio. Após isso foi utilizado um bastão de vidro para triturar e desfazer as fezes, e logo em seguida passou o conteúdo para um novo frasco através de uma peneira simples. Com uma pipeta de Pasteur foi feita a homogeneização da

solução e retirada de uma amostra, com ela preenchemos uma das células da câmara de McMaster, e foi repetido a operação para a outra célula. Após 5 minutos aguardamos para a flutuação dos ovos e observação ao microscópio. No final da contagem o número de ovos contados nas duas células da câmara McMaster foi multiplicado por 25. Com isso temos o número de oocistos por grama. As fezes das aves foram coletadas da cama, e não foi encontrado oocistos nela antes da inoculação. A coleta foi feita com idade de 9 dias, antes da inoculação dos coccídeos. Depois coletamos no dia da inoculação, animais com 15 dias de idade e coletamos também com 21 dias, 25 dias e 29 dias.

4.2 Avaliação da Sintomatologia Clínica e Características das Fezes

Foi avaliado se os animais apresentam apatia, prostração, penas eriçadas e presença de fezes na cloaca. E também se as fezes estavam ralas meio amarronzadas ou com presença de sangue na cama.

4.3 Avaliação da Bolsa de Fabricius e Timo

Foi avaliado bolsa e timo das aves. Para avaliação da bolsa foi utilizado um bursômetro, que serve como um parâmetro para o tamanho da bolsa, também foi avaliado visualmente se ele apresentava alguma alteração em sua coloração ou presença de alguma anormalidade. O timo também foi avaliado por visualização de coloração alterada ou alguma anormalidade presente.

4.4 Avaliação da Integridade Intestinal

Após 8 dias do desafio, os animais com 22 dias de idade foram eutanasiados e foi feita a primeira coleta para avaliação dos escores de lesões. Já a segunda coleta os animais tinham 17 dias de desafio, tendo 31 dias de idade, e foram eutanasiados para as avaliações das lesões. Os escores foram padronizados da seguinte forma: 0: sem lesão 1: lesão branda 2: lesão branda média 3: lesão média grave 4: Lesão grave. Além da avaliação dos escores intestinais foi feita a bursectometria e avaliação geral da Bursa de Fabricius. Também mensuramos o comprimento do intestino total, e observamos se havia

presença de fezes com sangue e se o intestino estava congestionado. Como são animais jovens também foi feita a avaliação do timo.

4.5 Morfometria

Aos 29 dias de idade, fragmentos de ceco foram coletados em formol tamponado 10% e enviados ao laboratório de Patologia da Universidade Federal de Uberlândia onde foram desidratados em álcool, diafanizados em xilol, incluídos em parafina, cortados e corados com hematoxilina eosina para a coloração das lâminas. Para a medição dos vilos e criptas usamos o programa ImageJ.

4.6 Análise Estatística

Foi realizada análise qualitativa e a diferença entre as médias pelo teste t considerando uma confiabilidade de 95% com uso do programa Graph PadPrism.

5 RESULTADOS

Na tabela 1 estão representados os valores médios das contagens de oocisto encontrados durante a avaliação da cama, entre o intervalo de 9 dias de idade até 29 dias de idade. Nas primeiras duas coletas não foi encontrado oocistos no grupo desafiado, mostrando que as aves não tiveram contato com coccídeos até o momento do desafio. Nos dias subsequentes a alta dose da vacina se mostrou eficaz em infectar as aves, levando a liberação de oocistos nas fezes. O grupo controle se manteve livre de coccídeos durante todo o experimento.

Tabela 1. Número de oocisto (OoPG) encontrados na cama.

Idade	Dias desafio	após	Grupo (desafiado) (OoPG)	1	Grupo (controle) (OoPG)	2
9 dias	0 dias		0		0	
15 dias	0 dia		0		0	
21 dias	6 dias		2000		0	
25 dias	10 dias		150		0	
29 dias	14 dias		1000		0	

Foi encontrado no grupo tratado presença de fezes com sangue, enquanto que no grupo controle não teve nenhuma alteração.

Na primeira coleta(22 dias de idade e 7 dias após o desafio) todas as aves de todos os grupos apresentavam bolsas hiperêmicas com hemorragias discretas. Já na segunda coleta (31 dias de idade e 16 dias após o desafio), no grupo tratado um animal apresentou bolsa hiperêmica com petéquias o restante desse grupo não teve alteração. No grupo controle dois animais apresentaram bolsa hiperêmica com petéquias, e o outro animal apresentou bolsa hiperêmica sem presença de petéquias.

Na tabela 2 estão apresentados os valores da avaliação da Bursa de Fabricius das aves.

Tabela 2. Média do escore do tamanho das bolsas dos diferentes grupos nas coletas 1 e 2.

Parâmetros	Coleta 1		P	Coleta 2		P
	Grupo tratado	Grupo controle		Grupo tratado	Grupo controle	
Bursectometria	5	4	>0.999	5	5	>0.999

Primeira coleta: 22 dias de idade, 7 dias após inoculação. Segunda coleta: 31 dias de idade, 16 dias após inoculação.

Na primeira coleta todas as aves de todos os grupos apresentavam timos hiperêmicos com petéquias. Na segunda coleta no grupo desafiado uma ave apresentou timo hiperêmico com petéquias e as outras duas apenas petéquias no timo. No grupo controle uma ave não teve alteração no timo, a outra ave teve presença de petéquias e a outra timo hiperêmico.

Não houve diferença estatística significativa no comprimento intestinal das aves, tanto na primeira quanto na segunda coleta.

Tabela 3. Medida do tamanho intestinal (cm) nas coletas 1 e 2.

Parâmetros	Coleta 1		P	Coleta2		P
	Grupo tratado	Grupo controle		Grupo tratado	Grupo controle	
Comprimento intestinal	84 (\pm 2)	77.33 (\pm 10,02)	0.322	106.3 (\pm 4.16)	97.67 (\pm 2.08)	0.322

Valor entre parêntese corresponde ao desvio padrão. Primeira coleta: 22 dias de idade, 7 dias após inoculação. Segunda coleta: 31 dias de idade, 16 dias após inoculação.

Escores do duodeno, jejuno, íleo e ceco nas duas coletas, estão apresentados na tabela 4. Na primeira coleta não houve alterações nas porções do intestino, porém na segunda coleta já foi possível ver alterações nas porções de duodeno jejuno e íleo embora no ceco não houve diferença estatística. As porções apresentavam petéquias na serosa ou/e mucosa, em algumas regiões estrias brancas, outras partes com bastante hiperemia.

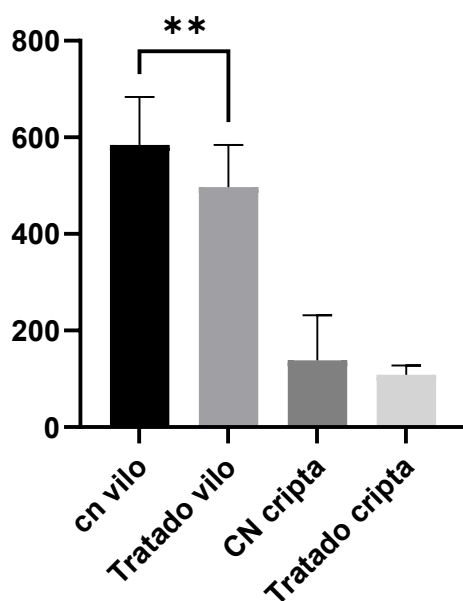
Tabela 4. Nível de escore do duodeno, jejuno, íleo e ceco primeira e segunda coleta.

Parâmetros	Coleta 1		P	Coleta 2		P
	Grupo tratado	Grupo controle		Grupo tratado	Grupo controle	
Escore Duodeno	0(0)	0(0)	>1	2(1)	0(0)	0.037
Escore Jejuno	0(0)	0(0)	>1	2(1)	0(0)	0.037
Escore Íleo	0(0)	0(0)	>1	2(1)	0(0)	0.037
Escore Ceco	1(1)	0(0)	>1	1(2)	0(1)	0.22

Valor entre parêntese corresponde ao IQR. Primeira coleta: 22 dias de idade, 7 dias após inoculação. Segunda coleta: 31 dias de idade, 16 dias após inoculação.

A análise da morfometria de vilo e cripta do ceco mostrou uma diminuição do vilo dos animais desafiados enquanto na cripta não houve diferença.

FIGURA 1. Média da altura de cripta (um) e vilos (um) em animais controle e animais tratados.



6 DISCUSSÃO

A *Eimeria.spp* afeta o intestino das aves e é responsável por gastos na prevenção e na manutenção dos animais acometidos (PEEK and LANDMAN, 2011). Nesse estudo o número de oocisto (Oopg) encontrados não se mostrou crescente nem constante, com 2000 na primeira coleta após o desafio, 150 na segunda coleta após o desafio e 1000 na terceira e última coleta após o desafio. A presença do oocisto na cama mostra que os oocistos estão ciclando no intestino das aves já que a inoculação dos protozoários foi realizada via gavagem.

No estudo de Waldenstedt et al. (2001) utilizando oocisto de *Eimeria máxima*, foram testados diferentes níveis de umidade para saber qual umidade serial ideal para esporulação dos oocistos, e foi mostrado que o nível com menor umidade foi o que teve melhor taxa de esporulação. Isso também foi evidenciado com Chapman et al. (2002) que demonstrou que uma umidade baixa também causará uma esporulação melhor.

No estudo de Chapman et al. (2002) são apresentadas outras variáveis que podem alterar na esporulação e concentração de oocistos na cama. Dentre elas está a densidade de aves, que o aumento dessa densidade vai gerar um aumento de oocistos, assim como uma cama com muita amônia e baixo oxigênio vai causar uma queda na quantidade de oocistos.

Houve alterações discretas na bolsa cloacal e no timo nos dois grupos. Essas alterações sugerem doenças que afetam o sistema imune. Como essa alteração ocorreu em ambos os grupos pode-se sugerir que há algum fator que possa estar contribuindo com a imunossupressão das aves. Oznurlu et al. (2010) mostra em seu estudo que um estresse térmico prolongado na fase de incubação, é um fator que afeta o desenvolvimento da bolsa cloacal e do timo, levando o animal a um quadro de imunossupressão.

Nesse trabalho foi observado sangue em algumas amostras de fezes do grupo inoculado, sugerindo que houve ciclagem dos oocistos com quebra da barreira intestinal. No entanto, o tamanho do intestino não apresentou uma diferença estatística entre o grupo tratado e o grupo controle. Se esperava que aconteceria uma redução do tamanho intestinal do grupo tratado, mas isso não

aconteceu. O mesmo foi visto em Wang et al (2019) onde o grupo desafiado com uma vacina viva contendo, *E. maxima*, *E. tenella*, *E. acervulina*, não teve uma diferença com o grupo controle.

Na avaliação de escore de lesões no segmento intestinal das aves não houve alterações significativas em nenhuma porção do grupo tratado, na primeira coleta. No entanto segunda coleta pode-se observar alterações significativas. As porções do duodeno, jejuno e íleo apresentavam lesões, enquanto a porção do ceco se manteve sem presença de lesões expressivas. Resultados semelhantes aos de Ritzi et al (2016), em que os grupos tratados com uma alta dose de vacina viva, *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. tenella*, apresentaram lesões. Tanto no duodeno quanto no jejuno, com diferença estatística entre os grupos. No íleo as lesões não foram tão significativas, e no ceco teve ausência de lesão.

A ausência ou baixa presença de lesões no ceco pode estar relacionado com a dosagem do desafio. O estudo de Teng et al (2020) ele trabalha com diferentes dosagens de oocistos no desafio, sendo oocisto de *E. maxima*, *E. acervulina*, *E. tenella*. E é visto que na região do ceco mesmo com uma dose de desafio alta a porcentagem de lesões sérias não aumenta, isso demonstra que as lesões nessa região não são tão fáceis de induzir.

Na análise da morfometria dos vilos e criptas do ceco, onde foi avaliado a média da altura deles, somente os vilos tiveram uma diminuição no grupo das aves desafiadas. Assim também como foi relatado por Teng et al (2020), onde o tamanho das vilosidades em duodeno e jejuno sofreram redução de 20%, causado pelo tratamento com a *Eimeria.spp*.

Comparando aos autores citados, neste estudo não foi possível criar uma inflamação e lesão graves nas aves utilizando vacina viva atenuada. Essa pesquisa mostrou que a vacina viva atenuada é capaz apenas de iniciar uma infecção branda. A presença de lesões discretas em timo e bolsa indica uma depressão no sistema imune que pôde ter contribuído com os sinais e lesões relatados nesse estudo. Estudos futuros testando uma dose maior da vacina viva atenuada e/ou utilizando substâncias imunossupressoras para facilitar a infecção devem ser conduzidos.

7 CONCLUSÕES

A vacina viva atenuada para coccidiose, administrada na dosagem de 10 vezes a dose recomendada, pode levar alterações nas aves, portanto, sendo uma aliada para estudos de quebra de barreira intestinal.

8 REFERÊNCIAS

- BLAKE, D. P., et al. "Re-calculating the cost of coccidiosis in chickens." *Vet Res* 51(1): 115, 2020.
- BLAKE, D. P. "Eimeria genomics: Where are we now and where are we going?" *Vet Parasitol* 212(1-2): 68-74, 2015.
- BROOM, L. J. and M. H. Kogut. "Inflammation: friend or foe for animal production?" *Poult Sci* 97(2): 510-514, 2018.
- CACHO, E.; GALLEGO, M.; LÓPEZ-BERNARD, F.; QUÍLEZ, J.; SÁNCHEZ-ACEDO, C. Expression of anti-apoptotic factors in cells parasitized by secondgeneration schizonts of *Eimeria tenella* and *Eimeria necatrix*. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 45, n. 3-4, p. 287-300, 2004.
- CHAPMAN, H. D., et al. "Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines." *Int J Parasitol* 32(5): 617-629, 2002.
- CHIKINA, Aleksandra S. et al. Macrophages maintain epithelium integrity by limiting fungal product absorption. *Cell*, v. 183, n. 2, p. 411-428. e16, 2020.
- COSTA, Carlos Alberto Fagonde. Controle da coccidiose: possíveis avanços. *Simpósio de Sanidade Avícola da UFSM*, v. 3, p. 36-47, 2002.
- FERNÁNDEZ-ROBLEDO, J. A. and G. R. VASTA. "Production of recombinant proteins from protozoan parasites." *Trends Parasitol* 26(5): 244-254, 2010.
- GARCIA, J. L.; GUIMARÃES JUNIOR, J. S.; BOGADO, A. L. G.; BUNGNI, F. M.; RAMALHO, D. C.; SOUZA, L. M. *Eimeria tenella*: utilization of a nasal vaccine with sporozoite antigens incorporated into iscom as protection for broilers breeders against a homologous challenge. *Experimental Parasitology*, v. 120, n. 2, p. 185-190, 2008.
- JUNIOR, Angelo Berchieri; MACARI, Marcos. *Doenças das aves*. Facta, 2000.
- KINNAIRD, J. H.; BUMSTEAD, A. M.; MANN, D. J.; RYAN, R.; SHIRLEY, M. W.; SHIELS, B. R.; TOMLEY, F. M. EtCRK2, a cyclin-dependent kinase gene expressed during the sexual and asexual phases of the *Eimeria tenella* life cycle. *International Journal for Parasitology*, Elmsford, v. 34, n. 6, p. 683-692, 2004.
- LI, MING-HSIEN; HUANG, HAI-I; OOI, HONG-KEAN. Prevalence, infectivity and oocyst sporulation time of rabbit-coccidia in Taiwan. *Tropical Biomedicine*, v. 27, n. 3, p. 424-429, 2010.
- LILLEHOJ, E. P.; YUN, C. H.; LILLEHOJ, H. S. Vaccines against the avian enteropathogens *Eimeria*, *Cryptosporidium* and *Salmonella*. *Animal Health Research Reviews*, v. 1, n. 1, p. 47-65, 2000a.
- MARTINS, Guilherme Felippelli et al. Uso de vacinas no controle da coccidiose aviária. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n. 3, p. 1165-1175, 2012.
- MEDZHITOV, R. "Inflammation 2010: new adventures of an old flame." *Cell* 140(6): 771-776, 2010.

MIN, W.; DALLOUL, R. A.; LILLEHOJ, H. S. Application of biotechnological tools for coccidia vaccine development. *Journal of Veterinary Science*, v. 5, n. 4, p. 279-288, 2004.

MORRIS, G. M., et al. "Investigating a persistent coccidiosis problem on a commercial broiler-breeder farm utilising PCR-coupled capillary electrophoresis." *Parasitol Res* 101(3): 583-589,2007

OZNURLU, Y., et al. "Histochemical and histological evaluations of the effects of high incubation temperature on embryonic development of thymus and bursa of Fabricius in broiler chickens." *Br Poult Sci* 51(1): 43-51,2010.

PEEK, H. W. and W. J. Landman. "Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies." *Vet Q* 31(3): 143-161,2011.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E. and E. DANTÁN-GONZÁLEZ . "Control of Avian Coccidiosis: Future and Present Natural Alternatives." *BioMed Research International* 2015: 430610,2015.

RITZI, M. M., et al. "Combination of probiotics and coccidiosis vaccine enhances protection against an *Eimeria* challenge." *Vet Res* 47(1): 111, 2016.

SHIRLEY, M. W.; SMITH, A. L.; BLAKE, D. P. Challenges in the successful control of the avian coccidia. *Vaccine*, Kidlington, v. 25, n. 30, p. 5540-5547, 2007.

TENG, P. Y., et al. "Graded *Eimeria* challenge linearly regulated growth performance, dynamic change of gastrointestinal permeability, apparent ileal digestibility, intestinal morphology, and tight junctions of broiler chickens." *Poult Sci* 99(9): 4203-4216,2020.

TOMASI, P. H. D. Avaliação de vacinas contra a coccidiose e a utilização de peptídeos em frangos de corte. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2006.

WALDENSTEDT, L., et al. "Sporulation of *Eimeria maxima* oocysts in litter with different moisture contents." *Poult Sci* 80(10): 1412-1415,2001.

WANG, X., et al. "Effects of coccidial vaccination and dietary antimicrobial alternatives on the growth performance, internal organ development, and intestinal morphology of *Eimeria*-challenged male broilers." *Poult Sci* 98(5): 2054-2065,2019.

WEISS, U. "Inflammation." *Nature* 454(7203): 427,2008.

YIN, G.; LIU, X.; ZOU, J.; HUANG, X.; SUO, X. Coexpression of reporter genes in the widespread pathogen *Eimeria tenella* using a double-cassette expression vector strategy. *International Journal for Parasitology*, Elmsford, v. 41, n. 8, p. 813-816, 2011.