



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALEXEY LEON GOMEL BOGADO

**AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE PROTETORA EM FRANGOS
DE CORTE VACINADOS COM PROTEÍNA
RECOMBINANTE rHsp70 DE *Eimeria tenella***

Londrina
2013

ALEXEY LEON GOMEL BOGADO

**AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE PROTETORA EM FRANGOS
DE CORTE VACINADOS COM PROTEÍNA
RECOMBINANTE rHsp70 DE *Eimeria tenella***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal - Área de Concentração em
Sanidade Animal, da Universidade Estadual de
Londrina, como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia

Co-orientador: Prof. Dr. José da Silva Guimarães
Junior

Londrina
2013

ALEXEY LEON GOMEL BOGADO

**AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE PROTETORA EM FRANGOS DE
CORTE VACINADOS COM PROTEÍNA RECOMBINANTE rHsp70 DE
*Eimeria tenella***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal - Área de Concentração em
Sanidade Animal, da Universidade Estadual de
Londrina, como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutor em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Luis Garcia
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Milton Hissashi Yamamura
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Odilon Vidotto
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Luiz Cesar Silva
UNOPAR – Londrina - PR

Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley
UNOPAR – Londrina - PR

Londrina, 7 de março de 2013.

Este estudo foi realizado no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias, Laboratório de Helminologia e Laboratório de Protozoologia, além do Setor de Isolamento do Hospital Veterinário, vinculados ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob orientação do Prof. Dr. João Luis Garcia e co-orientação do Prof. Dr. José da Silva Guimarães Junior.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa, abaixo relacionados:

- 1. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / MCT**
- 2. UEL: Universidade Estadual de Londrina.**

AGRADECIMENTO

Aos professores Dr. João Luis Garcia e Dr. José da Silva Guimarães Junior que muitas vezes dispensaram seu tempo para me orientar na execução do projeto de pesquisa e nas elaborações dos textos, contribuindo na minha formação profissional e pessoal.

Aos técnicos dos Laboratórios de Parasitologia e Protozoologia Dalva, Elisabete, Beatriz e Aldair.

Aos colegas e amigos dos Laboratórios de Helminologia, Parasitologia, Protozoologia e Zoonoses.

A todos os professores do curso de graduação e pós-graduação, pelos conhecimentos transmitidos e que também concederam atenção quando necessário.

A todos os funcionários, que de uma forma ou de outra contribuíram para meu aprendizado e para o desenvolvimento dos trabalhos do meu projeto de pesquisa.

Aos colegas de trabalho da UNOPAR pelo incentivo e colaboração para que eu pudesse desempenhar as atividades do doutorado.

Aos meus pais George “*in memorian*” e Beatriz pelo apoio e anos de empenho para me oferecer condições de vencer mais uma etapa em minha vida.

Às minhas irmãs Talita e Tatiana, com quem pude contar sempre.

À Amália, pelo companheirismo, apoio, compreensão e dedicação.

OBRIGADO!!

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

Albert Einstein (1879-1955).

BOGADO, A. L. G. **Avaliação da imunidade protetora de frangos de corte vacinados com proteína recombinante rHsp70 de *Eimeria tenella***. 2013. 64f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2013.

RESUMO

A epidemiologia da coccidiose aviária caracteriza-se por uma grande disseminação de oocistos no meio ambiente, podendo ocorrer significantes prejuízos em granjas com aves infectadas, fazendo-se necessárias, portanto, medidas profiláticas para o seu controle. Estas medidas são realizadas principalmente com o uso de anticoccídicos adicionados à ração. No entanto, o manejo incorreto e a falta de critérios definidos para o uso dessas drogas têm gerado sérios problemas de resistência. Somando-se a esse quadro, existe a pressão do mercado consumidor para banir drogas da alimentação animal. Pesquisas que visam à obtenção de vacinas para o controle da coccidiose são realizadas com a finalidade de buscar alternativas frente à quimioterapia usual. O objetivo do presente estudo foi clonar e expressar o gene HSP70 de *E. tenella* em *Escherichia coli*, bem como, imunizar frangos de corte e avaliar a imunidade protetora. Para isso 80 aves da linhagem Cobb, machos e fêmeas, com um dia de idade, foram alojadas em baterias metálicas com fornecimento de ração e água ad libitum, as quais foram distribuídas em quatro grupos (G1, G2, G3, e G4) com 20 aves cada. No sétimo dia do experimento os animais foram separados e os tratamentos realizados como segue: G1 – aves vacinadas com a proteína rHSP70 associada ao adjuvante (Quil-A, 50µg), G2 – aves não imunizadas e não desafiadas, G3 – aves não imunizadas e desafiadas e G4 – aves inoculadas com adjuvante Quil A (50µg). Foram realizadas duas doses da vacina via sub-cutânea, com 15 e 50µg nos dias 7 e 14, respectivamente. O mesmo foi realizado no G1 e G4 com PBS. No dia 24 foi feito o desafio com $5,0 \times 10^4$ oocistos de *Eimeria tenella* em todos os grupos, exceto o G2. Para a clonagem foi realizada a extração do RNA total dos esporozoítos pelo reagente TRIzol® de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi obtido a partir de 1 µg de RNA total através do kit de Protoscript® M-MuLV. Os oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene HSP70 foram confeccionados a partir da sequência Z46965 depositada no Genbank. Em seguida, os fragmentos de DNA necessários para a clonagem foram obtidos pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR), utilizando os oligonucleotídeos acima citados. A clonagem dos genes foi realizada no vetor pTrcHis2 TOPO® (Invitrogen, USA). Após a clonagem em bactérias *E. coli*, a proteína foi expressada e apresentou um tamanho de 23kDa, com rendimento de 5mg/L. Quando avaliado a imunidade protetora, a eliminação de oocistos apresentou diferença significativa entre os tratamentos, sendo que a taxa de aumento da fecundidade dos oocistos do grupo vacinado com rHSP70 foi 66% maior em relação aos grupos controles desafiados. Não houve diferença entre os tratamentos para o ganho de peso e escore de lesão. O título de anticorpos dos dias 24 e 31 do grupo vacinado com rHSP70 apresentou uma densidade óptica pelo menos duas vezes maior em relação aos grupos controles desafiados. A concentração de luteína plasmática do grupo vacinado não diferiu do grupo controle não desafiado. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a proteína rHSP70 promoveu um aumento da fecundidade dos oocistos e a concentração de luteína plasmáticas manteve-se nos mesmos níveis das aves não desafiadas, indicando uma proteção parcial contra o desafio realizado.

Palavras-chave: DNA. Clonagem. Imunogenicidade. Coccidiose. Biologia molecular.

BOGADO, A. L. G. **Protective immunity evaluation from broiler chickens immunized with recombinant Hsp70 from *Eimeria tenella***. 2013. 64f. Thesis (Doctorate Degree in Animal Science) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2013.

ABSTRACT

The epidemiology of avian coccidiosis is characterized by a wide spread of oocysts in the environment, significant damage may occur on farms with infected birds, making it necessary, therefore, preventive measures for their control. These steps are mainly carried out with the use of anticoccidíacos added to the feed. However, mismanagement and lack of criteria for the use of these drugs have generated serious resistance problems. Adding to this picture, there is the pressure of the consumer market for drugs ban animal feed. Research projects aimed at obtaining vaccines for the control of coccidiosis are performed in order to find alternatives to chemotherapy usual front. The aim of this study was to clone and express the gene HSP70 *E. tenella* in *Escherichia coli*, as well as immunize broiler chicks and assess protective immunity. For this 80 Cobb broilers, male and female, with a day old, were housed in battery cages to provide food and water ad libitum, which were divided into four groups (G1, G2, G3, and G4) with 20 chicks each. On the seventh day, the animals were separated and the treatments performed as follows: G1 - birds vaccinated with the protein rHSP70 associated with adjuvant (Quil-A, 50µg), G2 - birds unimmunized and unchallenged, G3 - birds do not immunized and challenged and G4 - birds inoculated with adjuvant Quil A (50 µg). There were two doses of the vaccine subcutaneously with 15 and 50µg on days 7 and 14, respectively. The same was done in G1 and G4 with PBS. On day 24 the challenge was made with 5.0×10^4 oocysts of *Eimeria tenella* in all groups except the G2. For cloning was performed from total RNA extracted from sporozoites by TRIzol® reagent according to the manufacturer's instructions. The cDNA was obtained from 1µg of total RNA using the kit Protoscript® M-MuLV. Primers specific for the HSP70 gene were constructed from the sequence deposited in Genbank Z46965. Then, the DNA fragments required for cloning were obtained by the technique of polymerase chain reaction (PCR) using the primers described above. The cloning of the genes was performed at pTrcHis2 TOPO® vector (Invitrogen, USA). After cloning in bacteria *E. coli*, protein was expressed and presented a size of 23kDa, yield 5 mg /L. When evaluated protective immunity, oocysts shedding significant difference between treatments, and the rate of increase in fecundity of oocysts rHSP70 vaccinated group was 66% higher compared to control groups challenged. There was no difference between treatments for weight gain and lesion score. The antibody titer on days 24 and 31 of the vaccinated group rHSP70 presented an optical density at least two fold higher compared to control groups challenged. The plasma concentration of lutein in the vaccinated group did not differ from the control group was not challenged. Based on these results, it is concluded that the protein rHSP70 promoted an increase in fertility of oocysts and plasma lutein concentration remained at the same levels of unchallenged birds, indicating partial protection against challenge done.

Keywords: DNA. Cloning. Immunogenicity. Coccidiosis. Molecular biology.

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA: Vacinas recombinantes no controle da coccidiose aviária: como avaliar a imunidade protetora?

Tabela 1 - Delineamento experimental na avaliação da imunidade protetora de vacinas de DNA e proteína recombinante dos anos de 2011, 2012 e 2013..... 31

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO: Avaliação da imunidade protetora em frangos de corte vacinados com proteínas recombinantes Hsp70 de *Eimeria tenella*.

Tabela 1 - Imunidade protetora com base no ganho de peso, redução do ganho de peso, produção de oocistos, fecundidade e taxa do aumento da fecundidade (TAF) das aves, avaliados no dia do desafio e uma semana após (dias 24 e 31) 53

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA: Vacinas recombinantes no controle da coccidiose aviária: como avaliar a imunidade protetora?

- Figura 1** - Fecundidade dos oocistos de *E. tenella*, onde a parte hachurada corresponde ao potencial reprodutivo. Adaptado de Williams (2001)..... 29
- Figura 2** - Esquema geral da avaliação experimental da imunidade protetora..... 30

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO: Avaliação da imunidade protetora em frangos de corte vacinados com proteínas recombinantes Hsp70 de *Eimeria tenella*.

- Figura 1** - Produtos amplificados da PCR correspondente ao gene parcial HSP70 de *Eimeria tenella*.. 49
- Figura 2** - Expressão e purificação em condições desnaturantes da proteína recombinante Hsp70 de *Eimeira tenella*.. 50
- Figura 3** - Efeito dos tratamentos nos níveis de anticorpos séricos no dia do desafio e uma semana após.. 51
- Figura 4** - Alinhamento do gene Hsp70. EtHsp70 (Z46965.1): sequencia depositada no GeneBank (número de acesso Z46965.1)..... 52

SUMÁRIO

REVISÃO DE LITERATURA	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 CONCEITOS E DEFINIÇÕES	14
3 PARAMETROS UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO DE VACINAS CONTRA A COCCIDIOSE AVIÁRIA	16
3.1 PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE PROTETORA	16
3.1.1 Ganho de Peso e Conversão Alimentar	16
3.1.2 Eliminação de Oocistos	18
3.1.3 Escore de Lesão	19
3.2 PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS	19
3.2.1 Teste ELISA	20
3.2.2 Western Blotting	21
3.2.3 Citometria de Fluxo	21
3.2.4 PCR em Tempo Real (qPCR)	21
3.2.5 Quantificação de Oxido Nítrico	22
3.2.6 Proliferação de Linfócitos	22
3.3 OUTROS PARÂMETROS	22
3.3.1 Dosagem de Carotenoides	22
4 CONCLUSÕES	24
5 REFERÊNCIAS	25
OBJETIVOS	33
GERAL	33
ESPECÍFICOS	33

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	34
1 INTRODUÇÃO	35
2 MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1 ANIMAIS UTILIZADOS	37
2.2 PURIFICAÇÃO DE ESPOROZOÍTOS	37
2.3 CLONAGEM DO GENE HSP70	37
2.4 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE Hsp70.....	38
2.5 MONTAGEM DA VACINA	39
2.6 IMUNIZAÇÃO E DESAFIO	39
2.7 AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE PROTETORA	39
2.8 QUANTIFICAÇÃO DE LUTEÍNA PLASMÁTICA	40
2.9 NÍVEIS DE ANTICORPOS SÉRICOS (IGY) ANTI-Hsp70	40
2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
3 RESULTADOS	42
3.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE Hsp70.....	42
3.2 AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE PROTETORA	42
3.3 QUANTIFICAÇÃO DA LUTEÍNA PLASMÁTICA	42
3.4 NÍVEIS DE ANTICORPOS SÉRICOS (IGY) ANTI-Hsp70	43
4 DISCUSSÃO	44
5 REFERÊNCIAS	47
CONCLUSÕES	54
APÊNDICES	55
APÊNDICE A - LISTA DE REAGENTES	56
APÊNDICE B - SOLUÇÕES E TAMPÕES	57
APÊNDICE C - PROTOCOLO DE TÉCNICAS	59

REVISÃO DE LITERATURA

Vacinas recombinantes no controle da coccidiose aviária: como avaliar a imunidade protetora?

Recombinant vaccines in the control of avian coccidiosis: how to evaluate protective immunity?

Resumo: A coccidiose tem um grande impacto econômico na avicultura mundial. Para o controle dessa importante parasitose faz-se necessário à adoção de medidas profiláticas, sendo uma delas o uso de medicamentos anticoccidianos adicionados à ração das aves. Devido aos problemas de resistência encontrados no campo e as exigências de alguns países para a retirada progressiva dos anticoccidianos, é de grande interesse para a indústria avícola a busca por alternativas a este manejo profilático. As vacinas utilizadas no controle da coccidiose incluem organismos vivos virulentos ou atenuados, vacinas de subunidades e vacinas de DNA. Para a avaliação do efeito protetor de vacinas em aves, podem ser utilizados diversos parâmetros, como: diretos (imunidade celular e humoral) e indiretos (ganho de peso, conversão alimentar, escore de lesão e eliminação de oocistos). Esta revisão tem como objetivo abordar os aspectos clínicos da coccidiose aviária, associando o efeito da imunidade sobre a o organismo da ave para um melhor entendimento dos principais parâmetros utilizados nos testes de vacinas vivas e vacinas não infectantes.

Palavras-chave: *Eimeria* spp. Frango de corte. Imunogenicidade. Proteínas. DNA.

Abstract: Coccidiosis has a major economic impact on the poultry industry. To control this important parasitic disease becomes necessary to adopt prophylactic measures, including the use of anticoccidial drugs added to poultry feed. Due to resistance problems found in the field and the demands of some countries to the phasing out of the anticoccidial, the poultry industry has great interest in the search for alternatives to this prophylactic management. The vaccines used in the control of coccidiosis include living organisms virulent or attenuated, subunit vaccines and recombinant DNA vaccines. To evaluate the protective effect of vaccines in poultry, can be used several parameters, such as: direct (humoral and celular immunity) and indirect (weight gain, feed conversion, lesion score and oocyst shedding). This review to approach the clinical aspects of the poultry coccidiosis, associating the effect of the immunity over to the organism of the bird for a better understanding about the principal parameters used in the tests of live vaccines and vaccines no infectives.

Key words: *Eimeria* spp. Broiler. Immunogenicity. Protein. DNA.

1 INTRODUÇÃO

A coccidiose aviária é uma parasitose intestinal causada por protozoários do gênero *Eimeria*, a qual provoca perdas econômicas no valor de mais de três bilhões de dólares por ano na indústria avícola do mundo inteiro (SHIRLEY et al., 2004; ZHANG, L. et al., 2012). Além da questão econômica, a busca por métodos de profilaxia que possam substituir os medicamentos anticoccidianos utilizados na ração de frangos de corte é justificada por vários argumentos.

Dentre os principais, está o manejo inadequado dos fármacos anticoccidianos, resultando na seleção de protozoários resistentes (CHAPMAN, 1997; VERMEULEN; SCHAAP; SCHETTERS, 2001; WILLIAMS, 1998), o desinteresse da indústria farmacêutica em investir na pesquisa de novos fármacos, devido aos altos custos (ALLEN; FETTERER, 2002), bem como o fato da população consumidora estar mais seletiva na escolha dos produtos de origem animal, evitando aqueles que foram tratados com medicamentos (MIN; DALLOUL; LILLEHOJ, 2004; VERMEULEN; SCHAAP; SCHETTERS, 2001) e, por fim, a exigência da retirada progressiva ou mesmo banimento das drogas para estabelecer acordos comerciais de mercados importadores de carne de frango (SHIRLEY; SMITH; BLAKE, 2007).

Uma das estratégias é o desenvolvimento de vacinas, as quais podem incluir organismos vivos virulentos ou atenuados e frações do parasita não infectivos, como as vacinas de DNA recombinante e proteínas recombinantes (HONG et al., 2006).

Na literatura mundial existem dois trabalhos (CHAPMAN et al., 2005b; WILLIAMS; CATCHPOLE, 2000) com revisão dos parâmetros utilizados para a avaliação de vacinas vivas contra a coccidiose aviária.

Esta revisão tem por objetivos abordar as vacinas recombinantes e os principais parâmetros utilizados na avaliação da imunidade protetora de frangos de corte.

2 CONCEITOS E DEFINIÇÕES

Para uma melhor compreensão dos parâmetros utilizados na avaliação da imunidade protetora, se faz necessário estabelecer alguns conceitos e definições das terminologias utilizadas nas pesquisas com este parasita.

A hemorragia do intestino, má absorção, diarreia e redução do ganho de peso, correspondem à patogenia da coccidiose, as quais ocorrem como resultado da alteração das funções do intestino (LILLEHOJ.; LILLEHOJ, 2000). De acordo com Williams (2002), a classificação da patogenicidade das *Eimeria* spp. pode ser dividida em coccidiose clínica, com a apresentação clássica da doença, onde a ave apresenta penas eriçadas, despigmentação do bico e das patas, diminuição do ganho de peso, aumento da conversão alimentar, diarreia ou disenteria, podendo levar a morte em alguns casos; coccidiose subclínica, cuja doença é caracterizada por uma diminuição no ganho de peso e aumento da conversão alimentar sem a presença de outros sinais e por fim a coccidíase, onde não há o desenvolvimento da doença e a sua forma clínica é evidenciada pela presença de oocistos na cama. Esta situação é onde observamos um pleno equilíbrio na relação parasito-hospedeiro.

Williams (1999) relata ser muito raro encontrar uma granja comercial de aves que não esteja contaminada por estes coccídeos, no entanto, os sinais clínicos mais severos da coccidiose são relativamente incomuns, enquanto a coccidiose subclínica é a maior responsável por perdas econômicas.

Outro fator importante da coccidiose aviária está relacionado à quantidade de oocistos eliminados nas fezes dos animais infectados (Figura 1). Alguns trabalhos abordam o termo potencial reprodutivo como sinônimo de fecundidade. Embora não tenham referências específicas na literatura que possam esclarecer se há realmente diferenças, caberia aqui uma sugestão para que os termos possam ser distinguidos.

O potencial reprodutivo é a habilidade máxima do parasita em se multiplicar no hospedeiro, resultando no maior número de oocistos produzidos por oocisto inoculado. Williams (2001) descreve esta condição como “crowding threshold” e esta habilidade é alcançada em condições específicas, como em inoculação de baixas doses de oocistos (10 a até 1000 oocistos), portanto trata-se de uma tendência, expectativa ou possibilidade.

A fecundidade é a relação do número de oocistos produzidos por oocisto inoculado (JOHNSTON et al., 2001). Trata-se de um resultado concreto que denota a

capacidade reprodutiva do parasita frente às adversidades que os oocistos inoculados podem encontrar, sofrendo variações por fatores como o “crowding effect”, sistema imune e uso de drogas anticoccidianas.

O efeito crowding é caracterizado pela diminuição da produção de oocistos quando é inoculado uma alta dose de oocistos esporulados nas aves (WILLIAMS, 2001). Em outras palavras, seria uma diminuição da fecundidade com o aumento da dose inoculada (JOHNSTON et al., 2001). Este efeito foi constatado primeiramente por Tyzzer (1932), onde o autor já sugeria que o mecanismo que resulta na diminuição de oocistos eliminados seria a depleção de células epiteliais do intestino pelas formas assexuadas do parasita, restando menos enterócitos viáveis que o necessário para o desenvolvimento de todos os gametócitos na fase de gametogonia, resultando na formação de menos oocistos.

O termo imunidade protetora é definido por Chapman et al. (2005a) como a redução ou ausência dos sinais clínicos da doença (coccidiose clínica ou subclínica), observada após a inoculação oral de oocistos vivos (desafio). Esta constatação é feita através da comparação do tratamento vacinal com os controles positivo e negativo por meio de métodos estatísticos. Algumas vezes a imunogenicidade pode ser confundida com a imunidade protetora. No entanto, o antígeno capaz de estimular a imunidade da ave, nem sempre é capaz de conferir imunidade protetora e evitar que a ave apresente sinais clínicos.

3 PARAMETROS UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO DE VACINAS CONTRA A COCCIDIOSE AVIÁRIA

Para refletir o estado de resistência ou suscetibilidade individual, é necessária a avaliação das vacinas que contenham o parasita vivo ou frações do parasita, sendo frequente o uso de parâmetros parasitológicos, imunológicos e clínicos após desafio com oocistos esporulados (ZHU et al., 2000b).

Muitos desses parâmetros foram originalmente utilizados para avaliar a eficácia de medicamentos anticoccidianos nas aves e o seu uso com o objetivo de avaliar vacinas vivas foi revisado por Chapman et al (2005a) e Williams; Catchpole, (2000). Uma visão geral dos delineamentos experimentais e dos parâmetros adotados em trabalhos que avaliam a imunidade protetora está descrita na Tabela 1.

Embora muitos trabalhos tenham avançado no conhecimento sobre a imunobiologia destes parasitas, ainda é válida a citação de Dalloul et al. (2007), que afirma haver uma limitação no conhecimento sobre este aspecto, desde o momento que o parasita promove a invasão e desenvolvimento intracelular, até a sua eliminação. Estas pesquisas de cunho básico são necessárias para compreender os detalhes da imunidade protetora e seu processo patofisiológico.

3.1 PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE PROTETORA

3.1.1 Ganho de peso e conversão alimentar

Novos parâmetros são abordados nos trabalhos dos últimos anos, principalmente com relação aos aspectos imunológicos, no entanto existe uma unanimidade entre os pesquisadores na utilização do ganho de peso (GP) como parâmetro primário na avaliação da imunidade protetora (Tabela 1)

O uso deste parâmetro se fundamenta no conceito de que as citocinas produzidas durante uma resposta imunológica atuam como intermediadoras do metabolismo, produzindo efeitos regulatórios na reprodução, homeostase, sistema neuroendócrino, diferenciação e desenvolvimento hematopoiético, além de outros processos de crescimento e resistência a doenças (JOHNSON, 1997; MIN et al., 2004).

De acordo com Williams (2002), os sinais clínicos em comum da coccidiose clínica e subclínica é a diminuição do ganho de peso e aumento da conversão alimentar. Sendo assim, caso não ocorra alteração nestes dois parâmetros, não há a caracterização de ave doente, independente se ela está eliminando oocistos ou se apresenta escore de lesão (WILLIAMS, 2003).

Para isso são necessários dois controles, sendo um positivo (não vacinado e desafiado) e um negativo (não vacinado e não desafiado). Trabalhos que avaliam vacinas de subunidades do parasita associadas ao adjuvante, geralmente formam grupo(s) a mais para avaliar o efeito do(s) adjuvante(s) (Tabela 1).

O grupo controle positivo devem exibir redução de ganho de peso significativo ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle negativo, para indicar doença intestinal.

Williams; Catchpole, (2000) propõem que a análise estatística dos resultados (realizado por ANOVA) seja capaz de caracterizar as aves sadias (controle negativo) e aves doentes (controle positivo) ao nível de significância de 1 ou 5%, deste modo o grupo vacinal irá demonstrar seu efeito de proteção através da capacidade em impedir ou diminuir a manifestação da doença (coccidiose clínica ou subclínica), onde a estatística apontará se o grupo vacinal difere do controle negativo ou do positivo ou de ambos (Figura 2).

No entanto, para obter a diferença estatística desejada nos controles, é necessário conhecer a cepa utilizada no desafio, de tal forma que a dose fornecida as aves cause a doença na forma subclínica, sem que haja mortalidade. Para isso faz-se uma avaliação prévia da dose a ser utilizada por meio da titulação da dose do desafio. Esta titulação define a dose correta para causar o efeito desejado nos parâmetros GP e CA e também nos parâmetro parasitológico eliminação de oocistos.

Esta titulação é feita em situações que a cepa utilizada para desafio é desconhecida, devido ao fato de ser adquirida a campo e não se conhecer o seu efeito em aves de determinada linhagem ou idade, os trabalhos fazem uso da titulação do desafio (BERA et al., 2010; DING et al., 2012; JENKINS et al., 2012; MA et al., 2011; SHIVARAMAIAH et al., 2011) por ser um importante passo antes de seguir com a avaliação da imunidade protetora.

O objetivo da titulação do desafio consiste na inoculação de várias doses para determinar de modo específico a dose necessária para causar diminuição de ganho de peso que seja estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para diferenciar os controles positivo do

negativo, além de permitir um melhor estudo da dinâmica de eliminação de oocistos (efeito “crowding”).

Para que se possa inferir a dose titulada ao experimento para avaliação da imunidade protetora, é desejável padronizar o máximo possível as variáveis existentes entre os dois testes, principalmente a linhagem e idade das aves ao desafio, período de armazenagem da cepa produzida, pois quanto maior o tempo de armazenagem menor a viabilidade dos oocistos, e tipo de ração utilizada.

Geralmente prioriza-se o uso da Análise de Variância para avaliar os parâmetros da imunidade protetora e, por conseguinte, o mesmo vale para a titulação do desafio, devido ao poder estatístico que esta análise possui. É importante verificar o número de tratamentos para estabelecer o número de repetições. Quanto maior o número de repetições, por consequência aumenta também o grau de liberdade do resíduo (erro). Deste modo há maiores chances de se obter um F calculado maior e há maiores chances das diferenças não serem atribuídas ao acaso e sim pelos efeitos dos tratamentos.

3.1.2 Eliminação de Oocistos

Por definição, a produção de oocistos demonstra a capacidade do parasita em se multiplicar no hospedeiro (CHAPMAN et al., 2005b). Deste modo, se espera que após o desafio, o controle positivo (aves não vacinadas e desafiadas) elimine a maior quantidade de oocistos por oocisto inoculado (expressão do potencial reprodutivo) e que o controle negativo não elimine oocistos e, finalmente, que ocorram mudanças na fecundidade do parasita inoculado nas aves vacinadas, levando-os a eliminar uma quantidade menor de oocistos por oocisto inoculado.

No entanto, para que a expectativa acima citada se cumpra, é necessário que o desafio seja composto de uma dose baixa, variando entre 100 a 1000 oocistos por ave, (CHAPMAN, 2005a; WILLIAMS; CATCHPOLE, 2000), evitando assim ocorrência do efeito “crowding”.

Song et al. (2010) comentam que alguns pesquisadores defendem o uso de duas doses de desafio, uma alta para avaliar o ganho de peso e outra baixa para observar as diferenças na eliminação de oocistos, mas muitos utilizam a mesma dose para avaliar estes dois parâmetros.

Com relação à utilização da mesma dose para avaliar os dois parâmetros, o pesquisador deve estar ciente de que um desafio com uma dose muito alta de oocistos, a

eliminação de oocistos poderá não demonstrar a verdadeira habilidade da vacina em estimular a imunidade das aves (WILLIAMS, 2001; WILLIAMS; CATCHPOLE, 2000). Enquanto uma dose baixa não será capaz de avaliar a imunidade protetora, pois ela não demonstra proteção contra coccidiose clínica ou subclínica (WILLIAMS; CATCHPOLE, 2000).

3.1.3 Escore de Lesão

O escore de lesão é um método subjetivo de avaliação da patologia macroscópica e dos danos físicos causados no local de interação parasita-hospedeiro (CHAPMAN et al., 2005b). Johnson, J.; Reid (1970) validaram este método de avaliação e classificaram as lesões de acordo com a gravidade em cinco níveis (0, +1, +2, +3 e +4), desde então, este escore é utilizado em avaliações de drogas e vacinas anticoccidianas.

Quando se utiliza o critério escore de lesão, é necessário diferenciar as lesões primárias e secundárias. A primeira resulta da primo infecção das aves com os oocistos, sendo observado em aves suscetíveis após o uso de vacinas vivas, também se observa uma diminuição no ganho de peso. As lesões secundárias ocorrem após um desafio em aves vacinadas, nas quais pode não ocorrer diminuição do ganho de peso. Quando se avalia histologicamente o tecido, são encontradas poucas formas de desenvolvimento do parasita, sugerindo que esta lesão tenha sido provocada pelo próprio sistema imune da ave (CHAPMAN et al., 2005b).

3.2 PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS

O desenvolvimento da resposta imune contra a coccidiose aviária é complexo, composto primeiramente pela imunidade não específica, seguido por mecanismos da imunidade específica (celular e humoral) (LILLEHOJ; MIN; DALLOUL, 2004; MIN; DALLOUL; LILLEHOJ, 2004), no entanto a resposta humoral tem pouco impacto na imunidade protetora (LILLEHOJ; OKAMURA, 2003; MIN; DALLOUL; LILLEHOJ, 2004).

Os tipos de citocinas produzidos durante a indução da resposta imune determinam a eficiência do combate ao parasita. Isto se deve ao fato das citocinas serem os maiores moduladores da resposta imune à infecção, levando muitos pesquisadores utilizarem as citocinas como adjuvante em vacinas (SHAH et al., 2011).

A Interleucina (IL) – 2 e o interferon gama (IFN- γ) são produzidos por linfócitos T helper (Th) 1, (OVINGTON; ALLEVA; KERR, 1995; SHAH et al., 2011),

ambos são indicadores da formação da imunidade protetora contra o parasita (LI et al., 2012), como resultado ocorre uma melhora nos parâmetros que avaliam a imunidade protetora.

Por outro lado, existem citocinas produzidas durante a infecção que são capazes de mediar a imunopatogenicidade, determinando uma queda no ganho de peso, aumento da eliminação de oocistos e escore de lesão. Fekete et al. (2007) relatam que nesta situação ocorre a liberação de mediadores pró-inflamatórios interleucina (IL)-1, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e principalmente IL-6. Zhang, L. et al. (2013) demonstrou que o mesmo efeito ocorre com o aumento dos níveis da IL-17.

Embora a imunidade protetora tenha uma relação estreita com o desenvolvimento da imunidade celular os testes apenas indicam quantitativamente ou qualitativamente se houve estímulo do sistema imune humoral ou celular, os quais possuem propriedades ou não de desenvolver a imunidade protetora. Portanto, os resultados deste teste criam a expectativa de melhoras nos parâmetros utilizados para avaliar a imunidade protetora, enquanto o ganho de peso, eliminação de oocistos e escore de lesão são os resultados concretos da proteção mediada por essas citocinas.

Os testes imunológicos utilizados com maior frequência são: teste ELISA, Western Blotting, citometria de fluxo e cultivo de leucócitos (Tabela 1). Os testes podem ser divididos conforme listado abaixo.

3.2.1 Teste ELISA

O teste de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) indireto tem por objetivo quantificar os níveis de anticorpos circulantes, informando se o sistema imune da ave foi estimulado pela vacina contendo o parasita vivo ou frações do parasita. Deste modo, Constantinoiu et al. (2008) reforça o uso deste teste como uma ferramenta para monitorar o desenvolvimento da imunidade em aves expostas ao parasita de forma natural ou por vacina.

Ao fazer a avaliação de uma vacina recombinante em aves, o teste imunoenzimático ELISA irá descrever a cinética de anticorpos durante a fase de imunização e desafio das aves, quantificando os níveis de IgY e/ou IgA intestinais, além de IgY sérico que interagem com as proteínas recombinantes testadas.

O teste ELISA também é empregado, geralmente por meio de kits, para quantificar citocinas como IL-2, IL-4, TGF- β e IFN- γ por meio de anti-anticorpos monoclonais, como demonstrado em recentes trabalhos (JANG et al., 2011a; 2011b; LEE et al., 2012; LI et al., 2012; SATHISH et al., 2011; SATHISH et al., 2012; ZHANG et al.,

2012; ZHANG et al., 2012). Desta forma é possível também estabelecer que tipo de resposta a vacina foi capaz de induzir.

3.2.2 Western Blotting

A técnica de Western Blotting tem sido frequentemente usada nos trabalhos de avaliação de vacinas contendo DNA ou proteínas recombinantes. O objetivo pode ser para detectar proteínas específicas em tecidos (músculo) (GERILETU et al., 2011; SHAH et al., 2011; SONG et al., 2012; ZHU, H. et al., 2012) ou cultivo celular produzidas a partir da vacinação com DNA recombinante. Também é utilizada para a confirmação de desenvolvimento de imunidade específica contra as proteínas ou para confirmação da expressão e purificação das proteínas (MA et al., 2011; SATHISH et al., 2012).

3.2.3 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é capaz de identificar e quantificar células em suspensão, que estão marcadas com anticorpos monoclonais específicos ligados a fluorocromos. Através desta técnica faz-se a detecção dos tipos de células predominantes após a vacinação e desafio, tais como células CD3+, CD4+ e CD8+, TLR2+ e TLR4+, a partir de leucócitos periféricos, esplênicos, do timo ou da bursa (DING et al., 2012; JANG et al., 2011a;2011b; LEE et al., 2012; LIU et al., 2013; ZHANG, L. et al., 2012)

De acordo com a predominância celular evocado pelo desafio, é possível determinar se o antígeno apresenta potencial para prevenir o aparecimento de sinais clínicos.

3.2.4 PCR em Tempo Real (qPCR)

A PCR em tempo real permite quantificar fragmentos do DNA ou RNA durante a reação por meio de compostos fluorescentes (NOVAIS; ALVES, 2004). Trata-se de uma ferramenta muito utilizada para detectar e quantificar a expressão gênica de vacinas de DNA nos tecidos dos animais, citocinas como as IL-2, IL-12, IL-17, IFN- γ e expressão de receptores celulares CD4+ e CD8+, TLR2+ e TLR4+ (GERILETU et al., 2011; SATHISH et al., 2011; SATHISH et al., 2012; SHAH et al., 2011; ZHANG, L. et al., 2012).

3.2.5 Quantificação de Óxido Nítrico

O interferon gama (IFN- γ), uma das mais importantes citocinas com função protetora contra as espécies de *Eimeria* spp (LILLEHOJ et al, 2000), é responsável pela ativação dos macrófagos, durante a fase inflamatória da resposta imune do hospedeiro, os quais têm a importante função de defesa contra as infecções por meio da liberação de altos níveis de NO (óxido nítrico), catalizado por INOS (óxido nítrico sintetase induzido) (MACMICKING et al., 1997)

A produção de óxido nítrico parece ser um excelente marcador da severidade da resposta inflamatória, apresentando uma correlação positiva com a dose de infecção e negativa com ganho de peso (ALLEN e FETTERER, 2002).

3.2.6 Proliferação de Linfócitos

Nos trabalhos com vacinas de proteínas ou DNA recombinantes é frequente o uso do cultivo para avaliar a proliferação de linfócitos. O resultado da proliferação ainda pode ser submetido a outras avaliações como a citometria de fluxo, qPCR e teste ELISA. As células avaliadas no cultivo celular geralmente advêm do sangue periférico, baço e linfócitos intraepitelial e em menor parte das tonsilas cecais e timo (DING et al., 2012; JANG et al., 2011a;2011b; LEE et al., 2012; LIU et al., 2013; ZHANG, L. et al., 2012).

3.3 OUTROS PARÂMETROS

3.3.1 Dosagem de Carotenoides

A luteína é o carotenoide em maior concentração encontrado em tecidos e sangue das galinhas (THURNHAM, 2007). Além disso, há uma correlação negativa entre os níveis de carotenoides observados no plasma, fígado e pele de aves em fase de crescimento e a resposta de fase aguda iniciada por um desafio (KOUTSOS; CALVERT; KLASING, 2003). Estes autores sugerem que mudanças na concentração de caroteno pós-infecção está diretamente associada à resposta inflamatória, podendo ter um papel na imunidade protetora.

Por esse motivo, a medida dos níveis de carotenoides plasmáticos é um parâmetro de grande sensibilidade, podendo variar até quando ocorre a forma mais branda da infecção causada pelas espécies *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*, podendo servir como

indicador da integridade fisiológica do intestino e ceco (CONWAY; MCKENZIE; DAYTON, 1990; CONWAY et al., 1993).

Este parâmetro é muito pouco utilizado nos trabalhos que fazem avaliação de vacinas contra coccidiose, no entanto, se deve dar uma atenção para os efeitos da suplementação da luteína na ração de aves desafiadas com o objetivo de estabelecer melhor o seu papel durante a infecção pelas *Eimeria* spp.

4 CONCLUSÕES

A avaliação da imunidade protetora das aves é o último passo de todos os processos que envolvem o estudo de um antígeno. O conhecimento das limitações de cada um dos parâmetros utilizados para este fim, bem como, as exigências do delineamento experimental é o que determinará os resultados conclusivos, os quais apontarão por meio da estatística se o antígeno foi capaz de promover uma proteção total, parcial ou se não houve proteção.

5 REFERÊNCIAS

- ALLEN, P. C.; FETTERER, R. H. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, n. 1, p. 58-65, 2002.
- BERA, A. K. et al. Effect of heat killed *Mycobacterium phlei* on body weight gain and management of caecal coccidiosis in broiler chickens. **Res Vet Sci**, v. 89, n. 2, p. 196-9, 2010.
- CHAPMAN, H. D. Biochemical, genetic and applied aspects of drug resistance in *Eimeria* parasites of the fowl. **Avian Pathol**, v. 26, n. 2, p. 221-44, 1997.
- CHAPMAN, H. D. et al. Acquisition of immunity to *Eimeria maxima* in newly hatched chickens given 100 oocysts. **Avian Dis**, v. 49, n. 3, p. 426-9, 2005a.
- CHAPMAN, H. D. et al. Guidelines for evaluating the efficacy and safety of live anticoccidial vaccines, and obtaining approval for their use in chickens and turkeys. **Avian Pathol**, v. 34, n. 4, p. 279-90, 2005b.
- CONSTANTINOIU, C. C. et al. Antibody response against endogenous stages of an attenuated strain of *Eimeria tenella*. **Vet Parasitol**, v. 154, n. 3-4, p. 193-204, 2008.
- CONWAY, D. P.; MCKENZIE, M. E.; DAYTON, A. D. Relationship of coccidial lesion scores and weight gain in infections of *Eimeria acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella* in broilers. **Avian Pathol**, v. 19, n. 3, p. 489-96, 1990.
- CONWAY, D. P. et al. Effects of different levels of oocyst inocula of *Eimeria acervulina*, *E. tenella*, and *E. maxima* on plasma constituents, packed cell volume, lesion scores, and performance in chickens. **Avian Dis**, v. 37, n. 1, p. 118-23, 1993.
- DALLOUL, R. A. et al. Unique responses of the avian macrophage to different species of *Eimeria*. **Mol Immunol**, v. 44, n. 4, p. 558-66, 2007.
- DING, J.; QIAN, W.; LIU, Q. Multi-epitope recombinant vaccine induces immunoprotection against mixed infection of *Eimeria* spp. **Parasitol Res**, v. 110, n. 6, p. 2297-306, 2012.
- FEKETE, S. G.; KELLEMS, R. O. Interrelationship of feeding with immunity and parasitic infection: a review. **Vet Med – Czech**, n. 52, p. 131-143, 2007.
- GERILETU et al. Vaccination of chickens with DNA vaccine expressing *Eimeria tenella* MZ5-7 against coccidiosis. **Vet Parasitol**, v. 177, n. 1-2, p. 6-12, 2011.
- HONG, Y. H. et al. Analysis of chicken cytokine and chemokine gene expression following *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 114, n. 3-4, p. 209-23, 2006.
- JANG, S. I. et al. Montanide IMS 1313 N VG PR nanoparticle adjuvant enhances antigen-specific immune responses to profilin following mucosal vaccination against *Eimeria acervulina*. **Vet Parasitol**, v. 182, n. 2-4, p. 163-70, 2011a.

_____. Montanide ISA 71 VG adjuvant enhances antibody and cell-mediated immune responses to profilin subunit antigen vaccination and promotes protection against *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella*. **Exp Parasitol**, v. 127, n. 1, p. 178-83, 2011b.

_____. Mucosal immunity against *Eimeria acervulina* infection in broiler chickens following oral immunization with profilin in Montanide adjuvants. **Exp Parasitol**, v. 129, n. 1, p. 36-41, 2011c.

JENKINS, M. C. et al. Gel-Bead Delivery of *Eimeria* oocysts protects chickens against coccidiosis. **Avian Dis**, v. 56, n. 2, p. 306-9, 2012.

JOHNSON, J.; REID, W. M. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. **Exp Parasitol**, v. 28, n. 1, p. 30-6, 1970.

JOHNSON, R. W. Inhibition of growth by pro-inflammatory cytokines: an integrated view. **J Anim Sci**, v. 75, n. 5, p. 1244-55, 1997.

JOHNSTON, W. T. et al. Modelling host cell availability and the crowding effect in *Eimeria* infections. **Int J Parasitol**, v. 31, n. 10, p. 1070-81, 2001.

KIM, D. K. et al. Effects of novel vaccine/adjuvant complexes on the protective immunity against *Eimeria acervulina* and transcriptome profiles. **Avian Dis**, v. 56, n. 1, p. 97-109, 2012.

KOUTSOS, E. A.; CALVERT, C. C.; KLASING, K. C. The effect of an acute phase response on tissue carotenoid levels of growing chickens (*Gallus gallus domesticus*). **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 135, n. 4, p. 635-46, 2003.

LEE, S. H. et al. Evaluation of novel adjuvant *Eimeria* profilin complex on intestinal host immune responses against live *E. acervulina* challenge infection. **Avian Dis**, v. 56, n. 2, p. 402-5, 2012.

LI, J. et al. Efficacy of *Eimeria tenella* rhomboid-like protein as a subunit vaccine in protective immunity against homologous challenge. **Parasitol Res**, v. 110, n. 3, p. 1139-45, 2012.

LILLEHOJ, H.; OKAMURA, M. Host Immunity and Vaccine Development to Coccidia and *Salmonella* Infections in Chickens. **J. Poult. Sci**, v. 40, n. 3, p. 151-193, 2003.

LILLEHOJ, H. S.; LILLEHOJ, E. P. Avian coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. **Avian Dis**, v. 44, n. 2, p. 408-25, 2000.

LILLEHOJ, H. S.; MIN, W.; DALLOUL, R. A. Recent progress on the cytokine regulation of intestinal immune responses to *Eimeria*. **Poult Sci**, v. 83, n. 4, p. 611-23, 2004.

LIU, Y. et al. Protective immunity induced by a DNA vaccine encoding *Eimeria tenella* rhomboid against homologous challenge. **Parasitol Res**, v. 112, n. 1, p. 251-7, 2013.

MA, D. et al. Vaccination of chickens with DNA vaccine encoding *Eimeria acervulina* 3-1E and chicken IL-15 offers protection against homologous challenge. **Exp Parasitol**, v. 127, n. 1, p. 208-14, 2011.

- MACMICKING, J. D.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. F. Nitric oxide and macrophage function. **Annu Rev Immunol**, v. 15, p. 323–350, 1997.
- MIN, W.; DALLOUL, R. A.; LILLEHOJ, H. S. Application of biotechnological tools for coccidia vaccine development. **J Vet Sci**, v. 5, n. 4, p. 279-88, 2004.
- NOVAIS, C. M.; ALVES, M. P. PCR em Tempo Real. **Biotecnologia Ciênc Desenvolv**, v. 33, p. 10-13, 2004.
- OVINGTON, K. S.; ALLEVA, L. M.; KERR, E. A. Cytokines and immunological control of *Eimeria* spp. **Int J Parasitol**, v. 25, n. 11, p. 1331-51, 1995.
- SATHISH, K. et al. Plant expressed EtMIC2 is an effective immunogen in conferring protection against chicken coccidiosis. **Vaccine**, v. 29, n. 49, p. 9201-8, 2011.
- SATHISH, K. et al. Plant expressed coccidial antigens as potential vaccine candidates in protecting chicken against coccidiosis. **Vaccine**, v. 30, n. 30, p. 4460-4, 2012.
- SHAH, M. A. et al. Construction of DNA vaccines encoding *Eimeria acervulina* cSZ-2 with chicken IL-2 and IFN-gamma and their efficacy against poultry coccidiosis. **Res Vet Sci**, v. 90, n. 1, p. 72-7, 2011.
- SHIRLEY, M. W. et al. The *Eimeria* genome projects: a sequence of events. **Trends Parasitol**, v. 20, n. 5, p. 199-201, 2004.
- SHIRLEY, M. W.; SMITH, A. L.; BLAKE, D. P. Challenges in the successful control of the avian coccidia. **Vaccine**, v. 25, n. 30, p. 5540-7, 2007.
- SHIVARAMAIAH, S. et al. The role of an early Salmonella Typhimurium infection as a predisposing factor for necrotic enteritis in a laboratory challenge model. **Avian Dis**, v. 55, n. 2, p. 319-23, 2011.
- SONG, H. et al. The protective efficacy of chimeric SO7/IL-2 DNA vaccine against coccidiosis in chickens. **Res Vet Sci**, 2012.
- SONG, H. et al. Efficacy of DNA vaccines carrying *Eimeria acervulina* lactate dehydrogenase antigen gene against coccidiosis. **Exp Parasitol**, v. 126, n. 2, p. 224-31, 2010.
- THURNHAM, D. I. Bioequivalence of β -carotene and retinol. **J Sci Food Agric.**, v. 87, n. 1, p. 13-39, 2007.
- TYZZER, E. E. Criteria and Methods in the Investigation of Avian Coccidiosis. **Science**, v. 75, n. 1943, p. 324-8, 1932.
- VERMEULEN, A. N.; SCHAAP, D. C.; SCHETTERS, T. P. Control of coccidiosis in chickens by vaccination. **Vet Parasitol**, v. 100, n. 1-2, p. 13-20, 2001.
- WILLIAMS, R. B. Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccines for chickens. **Int J Parasitol**, v. 28, n. 7, p. 1089-98, 1998.
- _____. A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. **Int J Parasitol**, v. 29, n. 8, p. 1209-29, 1999.

_____. Quantification of the crowding effect during infections with the seven *Eimeria* species of the domesticated fowl: its importance for experimental designs and the production of oocyst stocks. **Int J Parasitol**, v. 31, n. 10, p. 1056-69, 2001.

_____. Anticoccidial vaccines for broiler chickens: pathways to success. **Avian Pathol**, v. 31, n. 4, p. 317-53, 2002.

_____. Anticoccidial vaccination: the absence or reduction of numbers of endogenous parasites from gross lesions in immune chickens after virulent coccidial challenge. **Avian Pathol**, v. 32, n. 5, p. 535-43, 2003.

WILLIAMS, R. B.; CATCHPOLE, J. A new protocol for a challenge test to assess the efficacy of live anticoccidial vaccines for chickens. **Vaccine**, v. 18, n. 13, p. 1178-85, 2000.

ZHANG, D. F. et al. Adjuvant effect of ginsenoside-based nanoparticles (ginsomes) on the recombinant vaccine against *Eimeria tenella* in chickens. **Parasitol Res**, v. 110, n. 6, p. 2445-53, 2012.

ZHANG, L. et al. *Eimeria tenella*: Interleukin 17 contributes to host immunopathology in the gut during experimental infection. **Exp Parasitol**, v. 133, n. 2, p. 121-30, 2013.

ZHANG, L. et al. *Eimeria tenella* heat shock protein 70 enhances protection of recombinant microneme protein MIC2 subunit antigen vaccination against *E. tenella* challenge. **Vet Parasitol**, v. 188, n. 3-4, p. 239-46, 2012.

ZHU, H. et al. Identification and characterization of a cDNA clone-encoding antigen of *Eimeria acervulina*. **Parasitology**, v. 139, n. 13, p. 1711-9, 2012.

ZHU, J. J. et al. Analysis of disease resistance-associated parameters in broiler chickens challenged with *Eimeria maxima*. **Poult Sci**, v. 79, n. 5, p. 619-25, 2000.

Figura 1 - Fecundidade dos oocistos de *E. tenella*, onde a parte hachurada corresponde ao potencial reprodutivo. Adaptado de Williams (2001).

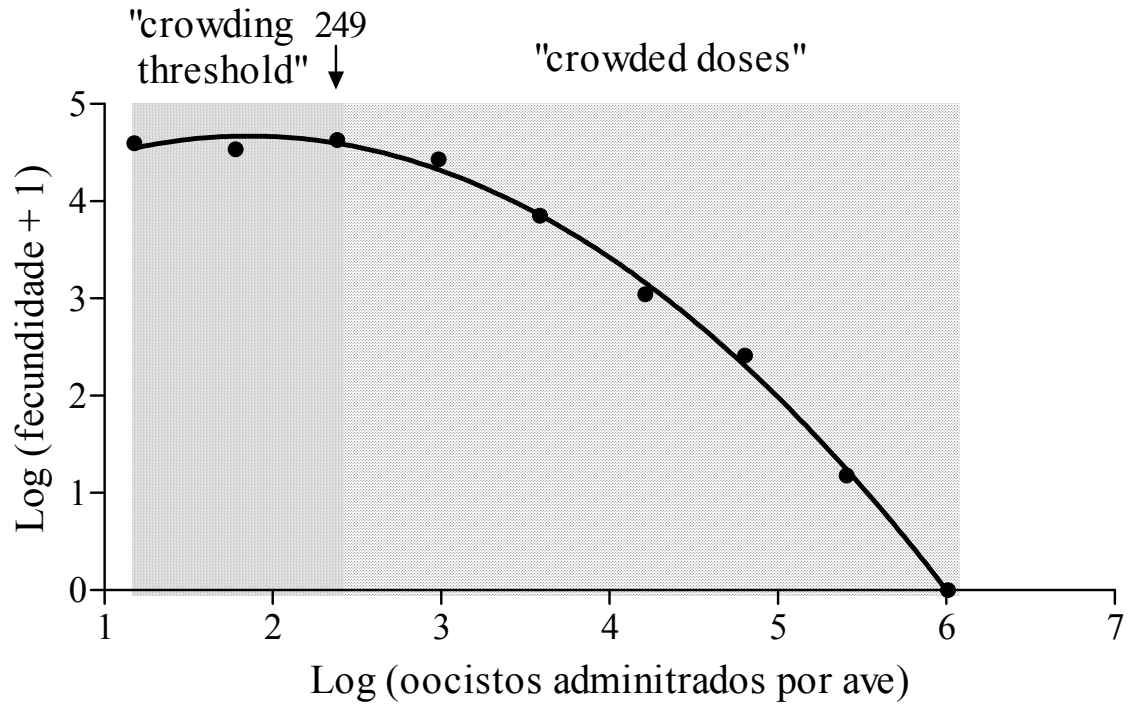


Figura 2 - Esquema geral da avaliação experimental da imunidade protetora. Ctrol (-) = controle negativo; Ctrol (+) = controle positivo; seta = desafio; $p < 0,05$ = apresenta significância estatística; $p > 0,05$ = não apresenta significância estatística e área hachurada = período da avaliação da imunidade protetora por meio do ganho de peso. a) Esquema do delineamento experimental para avaliar a imunidade protetora baseado no experimento realizado por Jang et al. (2011a), b) Curva de crescimento de frangos de corte sadios, desde o primeiro dia até o abate. A parte hachurada corresponde ao período em que foi avaliado o ganho de peso. c) Período de avaliação da imunidade protetora. d) Corresponde ao gráfico “c” com a inclusão do tratamento vacinal, demonstrando uma expectativa de resultado onde o tratamento vacinal (linha pontilhada final) difere ao nível de 5% do controle positivo e não difere do controle negativo. Os gráficos “b”, “c” e “d” foram adaptados do modelo estatístico proposto por Williams; Catchpole (2000).

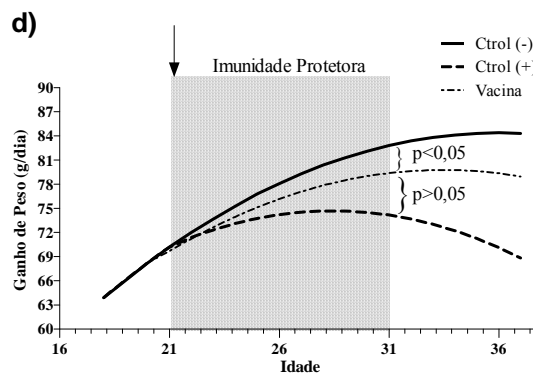
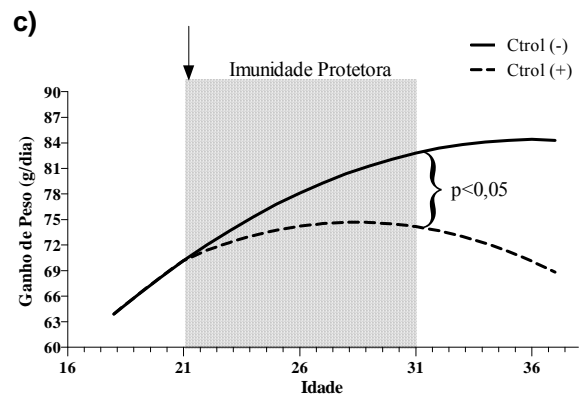
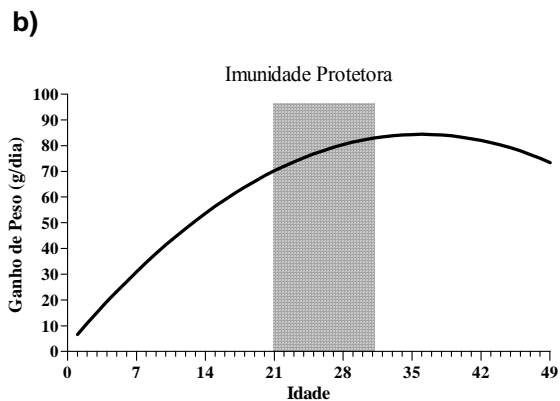
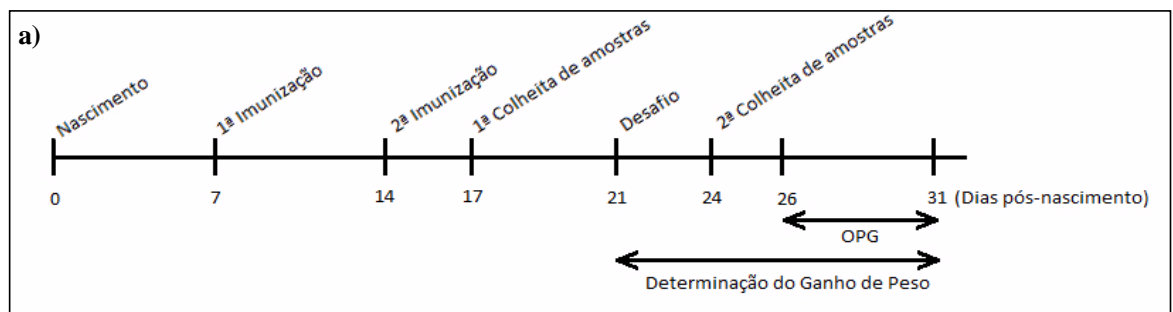


Tabela 1 - Delineamento experimental na avaliação da imunidade protetora de vacinas de DNA e proteína recombinante dos anos de 2011, 2012 e 2013.

Autores	Genes	Espécie	Vacina	Grupos	(n)	Dias	Via(s)	Desafio	Espécie	Dia	Parâmetros Imunológicos	Imunidade Protetora
Geriletu et al.(2011)	MZ5-7	<i>E. tenella</i>	DNA rec	5	30	14 e 21	IM	5x10 ⁴	<i>E. tenella</i>	28	Detec. MZ5-7 no músculo (WB) IL-2 e IFN-γ (qPCR)	GP, EL, OPG e ACI
Jang et al. (2011a)	Profilina	<i>E. acervulina</i>	Prot. rec.	7	18	7 e 14	SC/O/ N/OC	1x10 ⁴	<i>E. acervulina</i>	21	IgY e IgA (ELISA) K55, K1, TCR1, TCR2, BU1, HB2, CD4+ e CD8+ linfócitos epiteliais intestinais (CF)	GP, EL e OPG
Jang et al. (2011b)	3-1E (Profilina)	<i>E. acervulina</i>	Prot. rec	11	13	7 e 14	SC	1x10 ⁴	<i>E. acervulina</i> ou <i>E. tenella</i>	21	IgY anti-profilina (ELISA) Prolif. De linf. Esplênicos	GP e OPG
Jang et al. (2011c)	Profilina	<i>E. acervulina</i>	Prot. rec.	6	20	7 e 14	OC/SC/ O	1x10 ⁴	<i>E. acervulina</i>	21	IgY e IgA intestinal espec. Prolina (ELISA) CD4+, CD8+, TCR1+ e TCR2+ a partir de linfócitos intraepiteliais (CF)	GP e OPG
Ma et al. (2011)	3-1E (Profilina) IL-15	<i>E. acervulina</i> <i>G. gallus</i>	DNA rec	5	25	14 e 21	IM	5x10 ⁴	<i>E. acervulina</i>	28	Anti 3-1E (WB)	GP, EL, OPG e ACI
Sathish et al. (2011)	MIC2	<i>E. tenella</i>	Prot. rec. (plantas)	3	14	0, 7, 14 e 21	IM	1x10 ⁴	<i>E. tenella</i>	30	IgY espec. rMIC2 (ELISA) IFN-γ cultivo de linfócitos esplênicos (qPCR)	GP e OPG
Shah et al. (2011)	cSZ-2 IL-2 IFN-γ	<i>E. acervulina</i> <i>G. gallus</i> <i>G. gallus</i>	DNA rec	8	24	14 e 21	IM	1x10 ⁵	<i>E. acervulina</i>	28	Detec. cSZ-2 no músculo (qPCR) Detec. cSZ-2 no músculo (WB)	GP, EL, OPG e ACI
Ding; Qian; Liu et al. (2012)	TA4 Sp Gam56	<i>E. tenella</i> <i>E. acervulina</i> <i>E. maxima</i>	DNA e prot. rec	7	18	-	IM?	Alta dose 1-10x10 ⁴ Baixa dose 1x10 ³	<i>E. tenella</i> <i>E. acervulina</i> <i>E. maxima</i>	-	CD3+, CD4+ e CD8+ de linfócitos epiteliais intestinais (CF)	GP e OPG
Kim et al. (2012)	Profilina	<i>E. acervulina</i>	DNA e prot. rec.	4	20	1 e 7	SC	10 ⁴	<i>E. acervulina</i>	14	Prolif. De linf. Periféricos	GP, EL e OPG
Lee et al. (2012)	Profilina	<i>E. acervulina</i>	Prot. rec.	5	20	2 e 9	SC	1x10 ⁴	<i>E. acervulina</i>	16	CD4+, CD8+, TCR1, TCR2 linfócitos esplenicos (CF)	GP e EL
Li, J. et al. (2012)	Rhomboid	<i>E. tenella</i>	Prot. rec.	3	20	7, 14 e 28	IM	3x10 ⁴	<i>E. tenella</i>	42	IgG específico rRho IL-2 e IFN-γ (ELISA) CD4+ e CD8+ (CF)	GP, EL e OPG

Sathish et al. (2012)	MIC1 MIC2	<i>E. tenella</i>	Prot. rec. (plantas)	4	Var.	7, 14 e 21	IM	1x10 ⁴	<i>E. tenella</i>	30	Anti IgY espec. IFN- γ de cultivo (qPCR)	His ₅ (WB) MIC1 e MIC2 (ELISA)	GP e OPG
Song et al. (2012)	SO7 IL-2	<i>E. tenella</i> <i>Gallus gallus</i>	DNA e prot. rec.	6	30	14 e 21	IM	5x10 ⁴	<i>E. tenella</i>	28	Detec. SO7 no músculo (WB)		GP ACI Tx. Sobr.
Zhang, D. F. et al. (2012)	Profilina	<i>E. tenella</i>	Prot. rec.	7	30	3 e 17	SC	1,5x10 ⁴	<i>E. tenella</i>	31	IgG espec. Prolif. IL-1 (ensaio MTT)	Profilina De Linf. Periféricos (ELISA)	GP, EL e OPG
Zhang, L. et al. (2012)	Hsp70 MIC2	<i>E. tenella</i>	Prot. rec.	5	16	7 e 14	SC	3x10 ⁴	<i>E. tenella</i>	21	IgG espec. CD4+ e epiteliais IL-12, TLR2 e TLR4 (qPCR)	rMIC2 e CD8+ linfócitos intestinais (CF)	GP, EL e OPG
Zhu, H. et al. (2012)	cSZ-JN2	<i>E. acervulina</i>	DNA e prot.rec.	5	30	14 e 21	IM	1,2x10 ⁷	<i>E. acervulina</i>	28	Detec. cSZ-JN2 no músculo (WB) IgY anti-cSZ-JN2, IL-2, IL-4, IFN- γ e TGF-b (ELISA)		GP, EL, OPG e ACI
Liu et al. (2013)	Rhomboid (Rho)	<i>E. tenella</i>	DNA rec.	4	20	7, 14 e 28	IM	3x10 ⁴	<i>E. tenella</i>	28	IgG espec. IL-2 e CD4+ e CD8+ (CF)	Rho e IFN- γ (ELISA)	GP, EL e OPG

Legenda: DNA rec = DNA recombinante; Prot. rec. = Proteína recombinante; WB = Western Blotting; qPCR = PCR em tempo real; CF = Citometria de fluxo; GP = ganho de peso; EL = Escore de Lesão; OPG = Oocistos por grama (fezes); ACI = Índice anticoccidiano; Tx. Sobr. = Taxa de sobrevivência; IM = Intra muscular; SC = Sub cutâneo; O = Oral; Oc = Ocular; N = Nasal.

OBJETIVOS

GERAL

- Avaliar a imunidade protetora em frangos de corte (*Gallus gallus domesticus*), conferida pela vacina de proteína recombinante rHsp70 de *E. tenella*.

ESPECÍFICOS

- Clonar e expressar proteínas recombinantes de *Eimeria tenella* (Hsp70);
- Avaliar a imunidade protetora através do ganho de peso, escore de lesão e eliminação de oocistos;
- Avaliar o desenvolvimento da imunidade humoral pelo ensaio imunoenzimático ELISA;
- Dosar a concentração de luteína plasmática.

Avaliação da imunidade protetora em frangos de corte vacinados com proteína recombinante Hsp70 de *Eimeria tenella*.

Resumo: O gênero *Eimeria* é um parasito intracelular obrigatório que causa doença pela destruição das células em seu processo de replicação. Uma das estratégias para profilaxia desta parasitose é o desenvolvimento de vacinas, sendo a proteína Hsp70 (“heat shock protein 70”) uma forte candidata, conhecida por sua função de proteger o DNA da célula contra o estresse ambiental ou proveniente da resposta imune do hospedeiro. Os objetivos deste trabalho foi clonar, sequenciar e expressar as proteínas Hsp70 de *E. tenella*, bem como, imunizar frangos de corte para avaliar a resposta imune protetora frente a um desafio com oocistos esporulados. Após a clonagem em bactérias *E. coli*, a proteína foi expressa e apresentou um tamanho de 23kDa, com rendimento de 5mg/L. Quando avaliado a imunidade protetora, a eliminação de oocistos apresentou diferença significativa entre os tratamentos, sendo que a taxa de aumento da fecundidade dos oocistos do grupo vacinado com rHsp70 foi 66% maior em relação aos grupos controles desafiados. Não houve diferença entre os tratamentos para o ganho de peso e escore de lesão. O título de anticorpos dos dias 24 e 31 do grupo vacinado com rHsp70 apresentou uma densidade óptica pelo menos duas vezes maior em relação aos grupos controles desafiados. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a proteína rHsp70 promoveu um aumento da fecundidade dos oocistos e a concentração de luteína plasmáticas manteve-se nos mesmos níveis das aves não desafiadas, indicando uma proteção parcial contra o desafio realizado.

Palavras-chave: Coccidiose. Eimeriose. Biologia molecular. Clonagem. cDNA.

1 INTRODUÇÃO

A coccidiose aviária é uma parasitose intestinal causada por protozoários do gênero *Eimeria*, os quais provocam perdas econômicas no valor de mais de três bilhões de dólares por ano na indústria avícola do mundo inteiro (SHIRLEY et al., 2004; ZHANG et al., 2012).

Medicações profiláticas são utilizadas no controle da coccidiose, no entanto novas formas de controle são necessárias devido ao aparecimento de resistência dos parasitas aos produtos anticoccidianos e aos tratados comerciais que regulam o uso destas medicações na produção de frangos de corte (JANG et al., 2011; WILLIAMS, 2002).

As vacinas de proteínas recombinantes obtidas a partir das *Eimeria* spp, oferecem a possibilidade de desenvolver a imunidade protetora contra a coccidiose a partir de um antígeno específico, principalmente se associadas à adjuvantes (JANG et al., 2011; LILLEHOJ et al., 2005), podendo servir como alternativa ao uso dos agentes anticoccidianos.

Muitos antígenos são considerados alvos de estudos pelo potencial que tem em interagir com o sistema imune do hospedeiro, como as organelas do complexo apical (micronemas, roptrias, grânulos denso), elementos estruturais (conóide, anel polar e microtubulos), além de proteínas secretadas ou de membrana (MA et al., 2011).

De acordo com Martins et al. (2012) a identificação das proteínas expressas nos diferentes estágios do ciclo de vida do parasita é um dos passos na escolha das proteínas a serem utilizadas na confecção de uma vacina recombinante.

Neste contexto, a proteína de choque térmico (“heat shock protein” 70 – HSP70) tem surgido como um componente imunoestimulante para o desenvolvimento de vacinas de subunidades, (ZHANG et al., 2012). O gene HSP70 expressa uma proteína interna (LIU et al., 2009) de aproximadamente 70kDa (DEL CACHO et al., 2001), sendo que alguns pesquisadores ao trabalharem com uma parte do gene HSP70, observaram que a proteína expressa apresentou um grande potencial imunogênico (DE VENEVELLES et al., 2004; DUNN et al., 1995; LIU et al., 2009).

A comparação da proteína HSP70 entre diferentes organismos, de bactérias a seres humanos, tem revelado domínios altamente conservados (DEL CACHO et al., 2008). O seu papel é promover a manutenção da homeostasia e funções celulares dos efeitos

deletérios causados pelas condições de stress celular proveniente tanto do hospedeiro quanto do ambiente (DEL CACHO et al., 2008; ZHANG et al., 2012).

Os objetivos do presente estudo foram clonar e expressar o gene Hsp70 de *E. tenella* em *Escherichia coli*, bem como, imunizar e avaliar a imunidade protetora de frangos de corte.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Para o experimento foram utilizados frangos de corte, machos e fêmeas da linhagem Cobb com um dia de idade, livres de coccídeos, os quais foram alojados em baterias metálicas com fornecimento de ração e água *ad libitum*. O experimento foi conduzido em acordo aos princípios éticos do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (CEEAA/UUEL N. 96/09).

2.2 PURIFICAÇÃO DE ESPOROZOÍTOS

Esporozoítos de *E. tenella* foram purificados de acordo com Garcia et al. (2008), para isso oocistos foram esterilizados em hipoclorito de sódio e em seguida foram esporulados em dicromato de potássio 2,5%. Após a esporulação os oocistos foram lavados em PBS (Phosphate Buffered Saline) 10mM, pH 7.5 para a retirada do dicromato de potássio. A parede dos oocistos foi rompida em tubos de 50ml contendo PBS frio e esferas de vidro de 3mm, utilizando o vortex por cinco minutos. Os esporocistos obtidos foram suspensos em tubos de 50ml contendo Tripsina 0.25% e ácido taurodeoxicolato 4% (Sigma) em PBS e permaneceram sob agitação em banho-maria a 41°C por 45 minutos. Os esporozoítos excistados foram centrifugados, a 700 x g por 20 minutos e seguiram três lavagens em PBS. Sua concentração foi ajustada para 10⁷ esporozoítos/ml.

2.3 CLONAGEM DO GENE HSP70

O RNA total foi obtido dos esporozoítos pelo reagente TRIzol® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A partir da sequência do gene completo HSP70 depositada no banco de dados do GenBank (número de acesso: Z46965.1), foi selecionado um fragmento baseado na predição da hidrofobicidade de uma região do polipeptídeo, sendo utilizado oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene HSP70, os quais foram confeccionados pelo software “Premier Primer 5”. A sequência de cDNA que codifica o antígeno HSP70 de *Eimeria tenella* foi obtida por transcriptase reversa a partir de 1 µg de RNA total através do kit de Protoscript® M-MuLV (NEB). O quadro aberto de leitura (open read fram – ORF) do gene HSP70 foi amplificado pela PCR com os primers HSP70-F (5'- GAGAAAGAAGACGGACGCAC -3') e HSP70-R (5'-

CTGATACACCTTGATGCCCCAC -3'). Para a realização da PCR foram utilizados 2,5 µl de tampão 10 vezes concentrado (MgCl₂ 50 mM), 2 µl dNTPs (0,2 mM), primers Hsp70-F e R (20 pmol cada), enzima Taq Polimerase Platinum® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) (1U) e cDNA de *E. tenella* (50 ng), em um volume total de 25 µl. O processo de amplificação foi realizado por uma desnaturação prévia de 95°C por cinco minutos, acrescida de 35 ciclos de 94°C por um minuto, 60°C por 45 segundos, 72° por um minuto e uma extensão final a 72°C por 15 minutos. Todo o produto da amplificação foi analisado pela eletroforese em gel de agarose 1,5% corado por SYBR Green (Invitrogen, life Technologies, USA) e a banda de interesse foi recortada do gel para purificação do DNA usando o kit QIAquick - gel Extraction (Qiagen, QIAGEN Biotecnologia Brasil Ltda., São Paulo, Brazil). Este fragmento foi ligado ao vetor pTrcHis2 TOPO® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e em seguida os plasmídeos recombinantes foram inseridos pela reação de transformação em *E. coli* One Shot TOP10 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) conforme instruções dos fabricantes. O sequenciamento foi realizado a partir de uma colônia que estava expressando a proteína, da qual foi feita a PCR com os primers específicos para pTrcHis2 TOPO, após a purificação da banda de interesse do gel de agarose 1,5%, o DNA foi submetido ao sequenciamento dideoxy usando novamente os primers específicos para pTrcHis2 TOPO e confirmar a manutenção do ORF, conforme Igarashi et al. (2010), antes de realizar a expressão em maior escala.

2.4 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE HSP70

A expressão das proteínas foi realizada na cepa de *Escherichia coli* One Shot® TOP10 (Invitrogen), para isso as células cresceram em meio de cultura caldo LB contendo 100 µg/ml de ampicilina a 37°C até a densidade óptica (DO₆₀₀) alcançar 0,5-0,7, aferido em espectrofotômetro iMark microplate reader (BioRad, Hercules, CA, USA). A indução da expressão da proteína rHsp70 foi realizada em meio LB contendo 1mM de Isopropil-thio-D-Galactoside (IPTG) e crescimento por 4 horas a 37°C sob agitação. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em resina de níquel Ni-NTA (Qiagen, QIAGEN Biotecnologia Brasil Ltda., São Paulo, Brazil) em condições desnaturantes, com guanidina para fazer a lise e ligação na coluna, em seguida as lavagens e eluições com ureia a 8M. A solução final purificada foi dialisada em PBS e submetida e eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. A concentração das proteínas foi determinada com a utilização do Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific®).

2.5 MONTAGEM DA VACINA

Foram preparadas duas doses diferentes da vacina, sendo a primeira dose composta por 15µg da proteína rHSP70 e 50µg de Quil-A. A segunda dose foi composta por 50µg da proteína rHSP70 e 50µg de Quil-A.

2.6 IMUNIZAÇÃO E DESAFIO

Oitenta aves, com um dia de idade, foram alojadas em baterias metálicas distribuídas em quatro grupos (G1, G2, G3, e G4) com 20 aves cada. No sétimo dia do experimento os animais foram separados e os tratamentos realizados como segue: G1 – aves vacinadas com a proteína rHsp70 associada ao adjuvante (Quil-A, 50µg), G2 – aves não imunizadas e não desafiadas, G3 – aves não imunizadas e desafiadas e G4 – aves inoculadas com adjuvante Quil A (50µg). Foram realizadas duas doses da vacina via subcutânea, com 15 e 50µg nos dias 7 e 14, respectivamente. O mesmo foi realizado no G1 e G4 com PBS. No dia 24 foi feito o desafio com $5,0 \times 10^4$ oocistos de *E. tenella* em todos os grupos, exceto o G2.

2.7 AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE PROTETORA

O peso corporal foi mensurado em todos os grupos no dia do desafio e uma semana após (dias 24 e 31 respectivamente) para o cálculo do ganho de peso. O cálculo da porcentagem de aumento do ganho de peso foi feito de acordo com a descrição de Ma et al. (2011), conforme segue: $GP(\%) = (GPb/GPa) \times 100$, onde GP(%) é a porcentagem de aumento do ganho de peso em cada grupo, GPb é a média do ganho de peso no grupo avaliado e GPa é a média do ganho de peso do grupo controle não vacinado e não desafiado. O total de oocistos produzido nas fezes no período de quatro dias foi contado a partir de 1g de conteúdo fecal de um grupo de 12 aves por grupo, através da técnica de Gordon; Withlock (1939). A taxa de aumento de fecundidade (TAF) foi calculada como segue: $TAF (\text{por cento}) = (OT - OC) / OT \times 100$, onde OT é a contagem dos oocistos do tratamento, OC é a contagem dos oocistos do controle positivo. O escore de lesão foi avaliado de acordo com a técnica descrita por Johnson; Reid (1970), uma semana após o desafio (dia 31), sendo utilizadas quatro aves por grupo.

2.8 QUANTIFICAÇÃO DE LUTEÍNA PLASMÁTICA

A quantificação de luteína plasmática foi realizada conforme descrito por Bogado et al., (2012). Para isso foi colhido 0,5 mL de sangue com EDTA da veia braquial de quatro aves por grupo uma semana após o desafio (dia 31) para a quantificação de luteína plasmática. A extração do caroteno foi feita a partir de 150µl do plasma, o qual foi misturado com acetona na proporção de 1:10. Após a homogeneização em vortex, a amostra foi centrifugada a 10000xg por 10 minutos a temperatura de 4°C. O sobrenadante foi examinado em espectrofotômetro Cintra 20 GBC a 446nm e a concentração, em µg de luteína/ml de plasma, foi calculada com base no coeficiente de extinção da luteína em acetona, $E_{1cm}^{1\%} = 2340$.

2.9 NÍVEIS DE ANTICORPOS SÉRICOS (IGY) ANTI-HSP70

Nos dia do desafio e uma semana após, dias 24 e 31 respectivamente, foi colhido 0,5 mL de sangue da veia braquial de quatro aves de cada grupo. Após a obtenção do soro por centrifugação, foi realizada a mensuração da resposta imune por anticorpos específicos para a proteína Hsp70 por teste ELISA, segundo Garcia et al., (2008). Para isso placas de microtitulação foram adsorvidas “overnight” com 10µg/mL da proteína recombinante Hsp70 purificada, foram realizadas lavagens com Tween 20 a 0,05% e bloqueada com PBS contendo 1% de BSA. As amostras de soro foram incubadas em agitação contínua, em seguida os poços foram lavados. Em seguida foi adicionado o conjugado HRP anti-IgY (Laboratório de Bethyl, Montgomery, TX, EUA.) diluído 1:2.000 em PBS-tween20-5% leite em pó desnatado. Depois de lavar, a atividade da peroxidase foi revelada pela adição de 0.1ml de solução de ortofenilenodiamina (40mg ortofenilenodiamina/ 100ml de 0.1M fosfato citrato tamponado, pH 6.0, e 40µl de H₂O₂), e a reação foi bloqueada adicionando 0.05ml de HCl 1N. A densidade óptica (OD) foi lida a 490nm em um leitor de ELISA automático de microplaca (Bio-Rad, Richmond, CA). Um valor de OD corrigido (ODcorr) será calculado como segue: $OD_{corr} = [(OD_{amostra} - OD_{placa\ controle\ negativo}) / (OD_{placa\ controle\ positivo} - OD_{placa\ controle\ negativo})]$.

2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando significantes ($p < 0,05$), as médias das variáveis ganho de peso, eliminação de oocistos e

concentração de luteína plasmática foram comparadas pelo teste de Tukey. O escore de lesão foi analisado pelo teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis e quando significativo, seguiu o teste de comparações múltiplas para dados não paramétricos (teste de Dunn), sendo os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todas as análises foram realizadas por meio do programa estatístico BioStat 5.0 e os gráficos pelo PrismaGraphPad 5.

3 RESULTADOS

3.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE HSP70

Após realizar a eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR Green, foi observado a presença de fragmentos de 768pb obtidos a partir do cDNA e das colônias de bactérias contendo o plasmídeo recombinante pTrcHis2/Hsp70 (Figura 1). O sequenciamento resultou em uma similaridade de 100% do fragmento de cDNA obtido quando comparado com a única sequência depositada no GenBank (Figura 4). A indução com IPTG das células de *E. coli* One Shot® TOP10 (Invitrogen) resultou na expressão da proteína recombinante (r)Hsp70 contendo uma cauda de seis histidinas na porção C-terminal, que após submeter o purificado da fração insolúvel a eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, foi revelado um peso molecular de aproximadamente 23kDa (Figura 2). O rendimento da proteína purificada foi de 5,0 mg/L.

3.2 AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE PROTETORA

Os resultados da avaliação da imunidade protetora nas aves podem ser observados na Tabela 1. Quando o ganho de peso foi analisado nenhuma diferença estatística significativa foi observada ($p=0,74$). O ganho de peso relativo (GPr) foi 3,5% maior no grupo vacinado (G1) do que nos grupo não vacinados (G3 e G4). O total de oocistos eliminados após o desafio apresentou diferença estatística entre os grupos ($p=0,004$). Os animais do G1 eliminaram mais oocistos ($8,77 \times 10^8$) quando comparado com os animais do grupo controle não imunizado e desafiado G3 ($2,95 \times 10^8$) e o G1 não apresentaram diferença do G4 ($4,88 \times 10^8$). A fecundidade (Fe) dos oocistos foi maior no G1 ($Fe=1,75 \times 10^3$) apontando diferença estatística ($p=0,004$) em relação ao controle não imunizado e desafiado G3 ($Fe=0,59 \times 10^3$), porém, não houve diferença estatística entre o G1 e o G4 ($Fe=0,98 \times 10^3$). Desta forma, a Fe dos oocistos do G1 foi 66% maior que do G3. As médias de escore cecal foram G1=2,50; G3=3,00 e G4=2,25 ($p=0,31$).

3.3 QUANTIFICAÇÃO DA LUTEÍNA PLASMÁTICA

A avaliação da concentração de luteína plasmática apresentou diferença estatística entre os grupos ($p<0,05$), onde o grupo imunizado G1 não foi diferente do controle negativo não desafiado G2, apresentando as maiores concentrações de luteína plasmática (3,4

e 3,2 µg/mL respectivamente) e apresentou diferença dos grupos desafiados G3 e G4 com 2,2 e 2,3 µg/mL respectivamente (Tabela 1).

3.4 NÍVEIS DE ANTICORPOS SÉRICOS (IGY) ANTI-HSP70

As DOs médias dos níveis de anticorpos IgY contra a proteína recombinante rHsp70 foram G1= 1,11±1,02; G2= 0,17±0,11; G3= 0,27±0,22; G4= 0,08±0,13 aos 24 dias do experimento e G1= 0,93±0,99; G2= 0,01±0,02; G3= 0,48±0,96; G4= 0,04±0,08 mensuradas no dia 31 do experimento (sete dias após o desafio, Figura 3).

4 DISCUSSÃO

O uso de proteínas recombinantes para induzir a imunidade protetora contra a coccidiose aviária tem sido estudado com o objetivo compor uma vacina, servindo como uma alternativa aos agentes anticoccidianos utilizados atualmente na indústria avícola (DING et al., 2005; SONG et al., 2012). Uma dessas proteínas, considerada uma possível candidata a vacina, é a Hsp70.

São vários os trabalhos que isolaram, sequenciaram, expressaram e caracterizaram antigenicamente e imunologicamente o gene e as proteínas Hsp70 de *Eimeria* spp (BROWN et al., 2000; BUMSTEAD; DUNN; TOMLEY, 1995; DE VENEVELLES et al., 2004; DEL CACHO et al., 2005; DEL CACHO et al., 2008; DEL CACHO et al., 2001; DUNN et al., 1995; LAURENT et al., 1994; LIU et al., 2009). A imunidade protetora e o uso da Hsp70 como adjuvante foi avaliada recentemente por Zhang et al. (2012), indicando ser um forte imunopotenciador.

Este efeito é demonstrado através da capacidade da proteína rHsp70 potencializar a produção dos níveis de IL-12, IL-17 e IFN- γ (ZHANG et al., 2012), estas citocinas estão associadas a uma forte resposta Th1, a qual é importante para diminuir os sinais clínicos da coccidiose (DALLOUL; LILLEHOJ, 2005).

No presente estudo, as aves vacinadas com rHsp70 (G1) aumentaram a fecundidade dos oocistos em 66%. Embora o conceito de fecundidade dos oocistos já esteja descrito na literatura, esta é a primeira vez em que é utilizada para explicar o efeito protetor conferido por uma vacina, sendo um recurso necessário para uma melhor interpretação da eliminação de oocistos em situações em que o desafio provocou o efeito “crowding”.

O efeito crowding determina uma diminuição da produção de oocistos quando é inoculada uma alta dose de oocistos esporulados nas aves (WILLIAMS, 2001). Esta diminuição de oocistos eliminados ocorre devido à depleção de células epiteliais do intestino pela multiplicação das formas assexuadas do parasita, restando menos enterócitos viáveis que o necessário para o desenvolvimento de todos os gametócitos na fase de gametogonia, resultando na formação de menos oocistos.

Diante desta situação, foi proposto um novo cálculo para mensurar o efeito protetor conferido pelas vacinas às aves, chamado Taxa de Aumento de Fecundidade (TAF). Embora seja usual a utilização de uma dose que não resulte no efeito “crowding”

para estudar o efeito de uma vacina sobre a produção de oocistos, muitas vezes a dose do desafio necessária para diminuir o ganho de peso é alta e por esse motivo é necessário repetir o experimento fazendo uma dose de desafio menor para avaliar a proteção por meio da eliminação de oocistos, nesta situação a avaliação da TAF seria uma alternativa.

A interpretação deve partir do princípio que todos os grupos desafiados foram submetidos ao efeito crowding. Deste modo, o efeito da vacina resultaria em uma menor quantidade de merontes formados, sobrando mais células livres para o desenvolvimento dos gametócitos e uma quantidade maior de oocistos seriam eliminados. No entanto, mais estudos são necessários para que se chegue a valores mais condizentes ao nível de proteção estabelecido por este parâmetro.

A concentração da luteína plasmática no grupo vacinado com rHSP70 foi maior quando comparada com o grupo controle positivo, indicando que este parâmetro não sofreu interferência de outros fatores de variação. Este resultado oferece indícios de proteção, uma vez que mudanças na concentração de caroteno pós-infecção está diretamente associada à resposta inflamatória (KOUTSOS; CALVERT; KLASING, 2003).

A avaliação da cinética de anticorpos aferida no dia do desafio e uma semana após, apontou no grupo vacinal um pequeno decréscimo do título de anticorpos na semana seguinte ao desafio, indicando que esta queda talvez tenha ocorrido pela depleção dos anticorpos circulantes decorrente do desafio fornecido às aves.

O ganho de peso das aves não revelou diferenças estatísticas entre os grupos, isso ocorreu, provavelmente, pelo uso de aves machos e fêmeas nos grupos, o que aumentou o coeficiente de variação para esta variável, no entanto foi observado um aumento de 3,5% no ganho de peso do grupo imunizado com rHsp70.

Ao avaliar a proteína recombinantes de micronemas (MIC2) associada à Hsp70 como adjuvante, Zhang et al. (2012) verificaram que o potencial da Hsp70 em atuar como vacina foi maior do que a MIC2, isto foi verificado pelo aumento do ganho de peso em relação ao controle positivo.

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a proteína rHsp70 promoveu um estímulo da resposta imune humoral, um aumento da fecundidade dos oocistos e a concentração de luteína plasmáticas manteve-se nos mesmos níveis das aves não desafiada, indicando uma proteção parcial contra o desafio realizado.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil (número da concessão 578721/2008-2).

5 REFERÊNCIAS

- BOGADO, A. L. G. et al. The immunogenicity of *Eimeria tenella* sporozoite proteins and living oocyst vaccines in broilers. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 93-98, 2012.
- BROWN, P. J. et al. A microneme protein from *Eimeria tenella* with homology to the Apple domains of coagulation factor XI and plasma pre-kallikrein. **Mol Biochem Parasitol**, v. 107, n. 1, p. 91-102, Mar 15 2000.
- BUMSTEAD, J. M.; DUNN, P. P.; TOMLEY, F. M. Nitrocellulose immunoblotting for identification and molecular gene cloning of *Eimeria maxima* antigens that stimulate lymphocyte proliferation. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 2, n. 5, p. 524-30, Sep 1995.
- CHAPMAN, H. D. et al. Guidelines for evaluating the efficacy and safety of live anticoccidial vaccines, and obtaining approval for their use in chickens and turkeys. **Avian Pathol**, v. 34, n. 4, p. 279-90, Aug 2005.
- DALLOUL, R. A.; LILLEHOJ, H. S. Recent advances in immunomodulation and vaccination strategies against coccidiosis. **Avian Dis**, v. 49, n. 1, p. 1-8, Mar 2005.
- DE VENEVELLES, P. et al. Towards a reference map of *Eimeria tenella* sporozoite proteins by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. **Int J Parasitol**, v. 34, n. 12, p. 1321-31, Nov 2004.
- DEL CACHO, E. et al. Differences in Hsp70 expression in the sporozoites of the original strain and precocious lines of *Eimeria tenella*. **J Parasitol**, v. 91, n. 5, p. 1127-31, Oct 2005.
- DEL CACHO, E. et al. Hsp70 is part of the synaptonemal complex in *Eimeria tenella*. **Parasitol Int**, v. 57, n. 4, p. 454-9, Dec 2008.
- DEL CACHO, E. et al. *Eimeria tenella*: Hsp70 expression during sporogony. **J Parasitol**, v. 87, n. 5, p. 946-50, Oct 2001.
- DING, X. et al. In ovo vaccination with the *Eimeria tenella* EtMIC2 gene induces protective immunity against coccidiosis. **Vaccine**, v. 23, n. 28, p. 3733-40, May 25 2005.
- DUNN, P. P. et al. Isolation and sequences of cDNA clones for cytosolic and organellar Hsp70 species in *Eimeria* spp. **Mol Biochem Parasitol**, v. 70, n. 1-2, p. 211-5, Mar 1995.
- GARCIA, J. L. et al. *Eimeria tenella*: utilization of a nasal vaccine with sporozoite antigens incorporated into Iscom as protection for broiler breeders against a homologous challenge. **Exp Parasitol**, v. 120, n. 2, p. 185-90, Oct 2008.
- GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, v. 12, p. 50 - 52, 1939.

- IGARASHI, M. et al. Toxoplasma gondii: humoral and cellular immune response of BALB/c mice immunized via intranasal route with rTgROP2. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 19, n. 4, p. 210-6, Oct-Dec 2010.
- JANG, S. I. et al. Mucosal immunity against *Eimeria acervulina* infection in broiler chickens following oral immunization with profilin in Montanide adjuvants. **Exp Parasitol**, v. 129, n. 1, p. 36-41, Sep 2011.
- JOHNSON, J.; REID, W. M. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. **Exp Parasitol**, v. 28, n. 1, p. 30-6, Aug 1970.
- KOUTSOS, E. A.; CALVERT, C. C.; KLASING, K. C. The effect of an acute phase response on tissue carotenoid levels of growing chickens (*Gallus gallus domesticus*). **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 135, n. 4, p. 635-46, Aug 2003.
- LAURENT, F. et al. Cloning and expression of cDNA encoding an *Eimeria acervulina* 70 kDa sporozoite protein which is related to the 70 kDa heat-shock protein family. **Mol Biochem Parasitol**, v. 66, n. 2, p. 349-52, Aug 1994.
- LILLEHOJ, H. S. et al. Resistance to intestinal coccidiosis following DNA immunization with the cloned 3-1E *Eimeria* gene plus IL-2, IL-15, and IFN-gamma. **Avian Dis**, v. 49, n. 1, p. 112-7, Mar 2005.
- LIU, L. et al. Immunoproteomic analysis of the second-generation merozoite proteins of *Eimeria tenella*. **Vet Parasitol**, v. 164, n. 2-4, p. 173-82, Oct 14 2009.
- MA, D. et al. Vaccination of chickens with DNA vaccine encoding *Eimeria acervulina* 3-1E and chicken IL-15 offers protection against homologous challenge. **Exp Parasitol**, v. 127, n. 1, p. 208-14, Jan 2011.
- MARTINS, G. F. et al. The use of vaccines for chicken coccidiosis control. **Semina Ciênc Agrar**, v. 33, n. 3, p. 1165-1176, 2012.
- SHIRLEY, M. W. et al. The *Eimeria* genome projects: a sequence of events. **Trends Parasitol**, v. 20, n. 5, p. 199-201, May 2004.
- SONG, H. et al. The protective efficacy of chimeric SO7/IL-2 DNA vaccine against coccidiosis in chickens. **Res Vet Sci**, Dec 20 2012.
- WILLIAMS, R. B. Fifty years of anticoccidial vaccines for poultry (1952-2002). **Avian Dis**, v. 46, n. 4, p. 775-802, Oct-Dec 2002.
- WILLIAMS, R. B.; CATCHPOLE, J. A new protocol for a challenge test to assess the efficacy of live anticoccidial vaccines for chickens. **Vaccine**, v. 18, n. 13, p. 1178-85, Jan 18 2000.
- ZHANG, L. et al. *Eimeria tenella* heat shock protein 70 enhances protection of recombinant microneme protein MIC2 subunit antigen vaccination against *E. tenella* challenge. **Vet Parasitol**, v. 188, n. 3-4, p. 239-46, Sep 10 2012.

Figura 1 - Produtos amplificados da PCR correspondente ao gene parcial HSP70 de *Eimeria tenella*. Coluna 1 padrão de peso molecular 100pb (NEB, New England), Coluna 2 controle negativo, Coluna 3 fragmento amplificado a partir do cDNA e Coluna 4 fragmento amplificado a partir do plasmídeo pTrc2His/Hsp70 da colônia de bactérias que está expressando a proteína rHsp70.

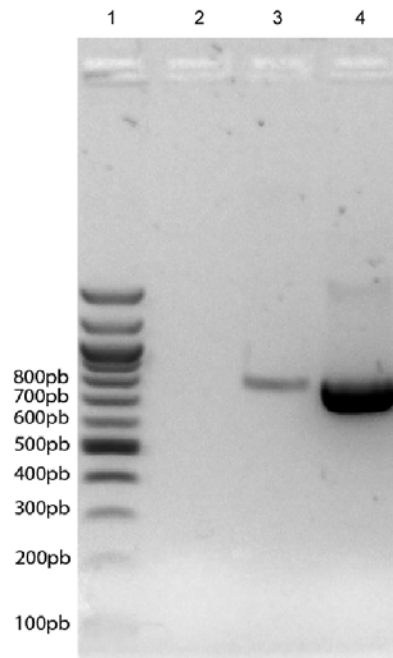


Figura 2 - Expressão e purificação em condições desnaturantes da proteína recombinante Hsp70 de *Eimeira tenella*. Coluna 1 peso molecular, coluna 2 lisado de bactérias, coluna 3 lisado de bactérias após passagem pela coluna com a resina de níquel, coluna 4 primeira eluição e coluna 5 segunda eluição.

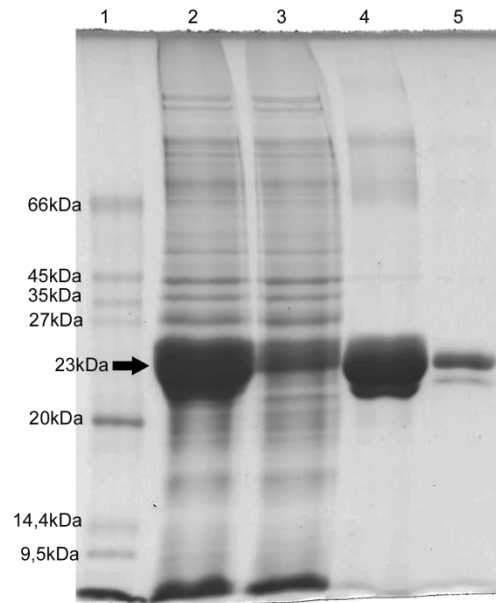


Figura 3 - Efeito dos tratamentos nos níveis de anticorpos séricos no dia do desafio e uma semana após. As aves do grupo G1 foram imunizadas com 15 e 50 μ g nos dias sete e 14, respectivamente, via subcutânea. Nos mesmos dias os grupos G2 (controle não desafiado) e G3 (controle desafiado) foram inoculados com solução salina, enquanto o G4 foi inoculado com Quil A. Os níveis de anticorpos séricos foram determinados por teste ELISA nos dias 24 e 31. Cada barra representa a média de quatro aves.

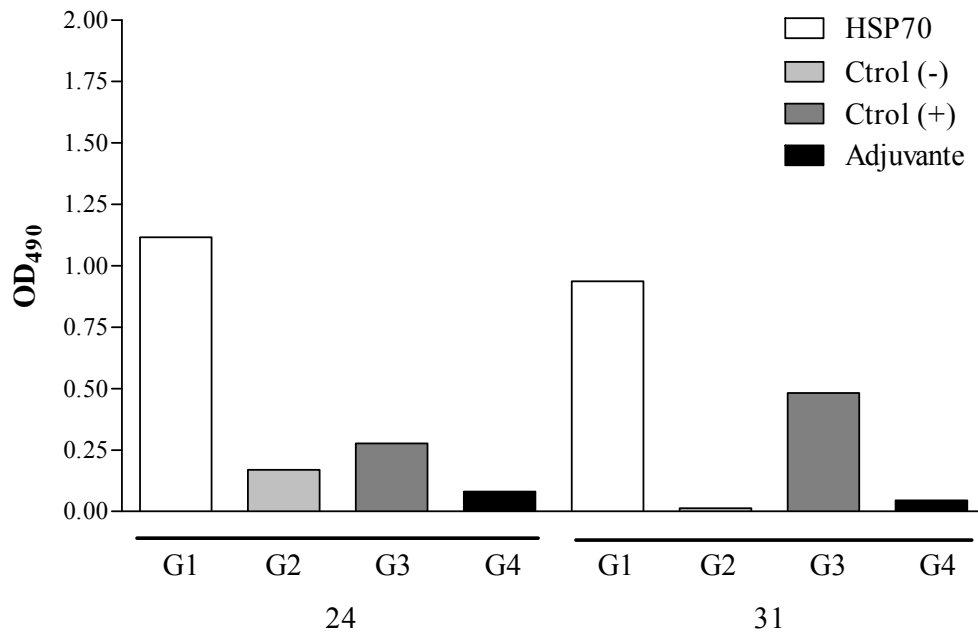


Figura 4 - Alinhamento do gene Hsp70. EtHsp70 (Z46965.1): sequencia depositada no GeneBank (número de acesso Z46965.1). Hsp70 UEL: sequenciamento do fragmento de cDNA clonado. Consensus: consenso das sequencias EtHsp70 (Z46965.1) e Hsp70 UEL. As sequências alinhadas apresentam 100% de similaridade.

EtHsp70 (Z46965.1)	CCCTGGCGTACGGTATGGAGAAAGAAGACGGACGCACCATAGCTGTCTATGACTTAGGTGGCGGAACCTTT
Hsp70 UEL	-----GAAAGAAGACGGACGCACCATAGCTGTCTATGACTTAGGTGGCGGAACCTTT
Consensus	CCCTGGCGTACGGTATGGAGAAAGAAGACGGACGCACCATAGCTGTCTATGACTTAGGTGGCGGAACCTTT
	850 860 870 880 890 900 910
EtHsp70 (Z46965.1)	CGACGTTTCAATCTTGGAGATATTGGGAGGAGTGTTTGAGGTGAAGGCGACCAATGGCAACACCAGCTTG
Hsp70 UEL	CGACGTTTCAATCTTGGAGATATTGGGAGGAGTGTTTGAGGTGAAGGCGACCAATGGCAACACCAGCTTG
Consensus	CGACGTTTCAATCTTGGAGATATTGGGAGGAGTGTTTGAGGTGAAGGCGACCAATGGCAACACCAGCTTG
	920 930 940 950 960 970 980
EtHsp70 (Z46965.1)	GGAGGGGAGGATTTTCGACCAGAAGGTGCTGCAGTTCCTGGTGAATGAGTTTAAAGAAGAAAGAGGGCATTG
Hsp70 UEL	GGAGGGGAGGATTTTCGACCAGAAGGTGCTGCAGTTCCTGGTGAATGAGTTTAAAGAAGAAAGAGGGCATTG
Consensus	GGAGGGGAGGATTTTCGACCAGAAGGTGCTGCAGTTCCTGGTGAATGAGTTTAAAGAAGAAAGAGGGCATTG
	990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
EtHsp70 (Z46965.1)	ATCTTAGCAAGGACCGGCTGGCTCTGCAGAGGCTACGCGAGGCTGCGGAAACCGCCAAAATCGAGCTGTC
Hsp70 UEL	ATCTTAGCAAGGACCGGCTGGCTCTGCAGAGGCTACGCGAGGCTGCGGAAACCGCCAAAATCGAGCTGTC
Consensus	ATCTTAGCAAGGACCGGCTGGCTCTGCAGAGGCTACGCGAGGCTGCGGAAACCGCCAAAATCGAGCTGTC
	1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
EtHsp70 (Z46965.1)	TTCGAAGCTTCAACTGAGATCAACCTCCCCTTCATCACCGCCGACCAATCCGGTCCCAAACATCTGCAG
Hsp70 UEL	TTCGAAGCTTCAACTGAGATCAACCTCCCCTTCATCACCGCCGACCAATCCGGTCCCAAACATCTGCAG
Consensus	TTCGAAGCTTCAACTGAGATCAACCTCCCCTTCATCACCGCCGACCAATCCGGTCCCAAACATCTGCAG
	1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190
EtHsp70 (Z46965.1)	GTCTCCCTCTCTCGTGCCCATCTCGAGGAGCTGGTTGGTGCAGTCTGCAACAAAGCATTGAGCCCTGCG
Hsp70 UEL	GTCTCCCTCTCTCGTGCCCATCTCGAGGAGCTGGTTGGTGCAGTCTGCAACAAAGCATTGAGCCCTGCG
Consensus	GTCTCCCTCTCTCGTGCCCATCTCGAGGAGCTGGTTGGTGCAGTCTGCAACAAAGCATTGAGCCCTGCG
	1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
EtHsp70 (Z46965.1)	AGAAATGCATAAGGGACGCAGGGGTGCAGAAGGCTGACCTGAGTGACGTCATTCTGGTGGGGGGGATGAC
Hsp70 UEL	AGAAATGCATAAGGGACGCAGGGGTGCAGAAGGCTGACCTGAGTGACGTCATTCTGGTGGGGGGGATGAC
Consensus	AGAAATGCATAAGGGACGCAGGGGTGCAGAAGGCTGACCTGAGTGACGTCATTCTGGTGGGGGGGATGAC
	1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330
EtHsp70 (Z46965.1)	CCGCATGCCCAAGGTTGCTGAGGTGTTGAAGAACAATTTCCACAAGGAGCCCTCTAAGGGCGTCAACCCG
Hsp70 UEL	CCGCATGCCCAAGGTTGCTGAGGTGTTGAAGAACAATTTCCACAAGGAGCCCTCTAAGGGCGTCAACCCG
Consensus	CCGCATGCCCAAGGTTGCTGAGGTGTTGAAGAACAATTTCCACAAGGAGCCCTCTAAGGGCGTCAACCCG
	1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400
EtHsp70 (Z46965.1)	GATGAGGCTGTGGCGCCGCGCCGCAATACAGGCGGGAGTCTTAAAGGGCGAGATCAAGGACCTGCTGC
Hsp70 UEL	GATGAGGCTGTGGCGCCGCGCCGCAATACAGGCGGGAGTCTTAAAGGGCGAGATCAAGGACCTGCTGC
Consensus	GATGAGGCTGTGGCGCCGCGCCGCAATACAGGCGGGAGTCTTAAAGGGCGAGATCAAGGACCTGCTGC
	1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470
EtHsp70 (Z46965.1)	TGCTCGATGTTTGCCCACTTTCTCTCGGCATTGAGACGCTTGGAGGCGTCTTCACGAGACTCATAAACCG
Hsp70 UEL	TGCTCGATGTTTGCCCACTTTCTCTCGGCATTGAGACGCTTGGAGGCGTCTTCACGAGACTCATAAACCG
Consensus	TGCTCGATGTTTGCCCACTTTCTCTCGGCATTGAGACGCTTGGAGGCGTCTTCACGAGACTCATAAACCG
	1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540
EtHsp70 (Z46965.1)	CAACACCACCATTCACCAAAAAGAGCCAGATCTTCTCTACTGCCGCGGACAACCAACGCAAGTGGGC
Hsp70 UEL	CAACACCACCATTCACCAAAAAGAGCCAGATCTTCTCTACTGCCGCGGACAACCAACGCAAGTGGGC
Consensus	CAACACCACCATTCACCAAAAAGAGCCAGATCTTCTCTACTGCCGCGGACAACCAACGCAAGTGGGC
	1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610
EtHsp70 (Z46965.1)	ATCAAGGTGTATCAGGGCGAGCGTGAATGGCCTCTGCCAACAACTGCTCGGTGAGTTTGTATTAGTTGG
Hsp70 UEL	ATCAAGGTGTATCAGGGCGAGCGTGAATGGCCTCTGCCAACAACTGCTCGGTGAGTTTGTATTAGTTGG
Consensus	ATCAAGGTGTATCAGGGCGAGCGTGAATGGCCTCTGCCAACAACTGCTCGGTGAGTTTGTATTAGTTGG

Tabela 1 - Imunidade protetora com base no ganho de peso, redução do ganho de peso, produção de oocistos, fecundidade e taxa do aumento da fecundidade (TAF) das aves, avaliados no dia do desafio e uma semana após (dias 24 e 31).

Tratamento	Ganho de peso (g ± DP)	Redução do GP (%)	Produção de oocistos (x10 ⁸ ± DP)	Fecundidade (x10 ³ ± DP)	TAF (%)	Escore de Lesão	Luteína (µg/mL ± DP)
G1 - Hsp70 recombinante	483 ± 46	94,5	8,77 ± 3,03 ^a	1,75 ± 0,61 ^a	66	2,50	3,4 ± 0,51 ^a
G2 - Controle não desafiado	511 ± 31	NC	0	NC	NC	0,00	3,2 ± 0,67 ^a
G3 - Controle desafiado	468 ± 69	91,4	2,95 ± 1,29 ^b	0,59 ± 0,26 ^b	0	3,00	2,3 ± 0,16 ^b
G4 - Adjuvante Quil A	468 ± 91	91,4	4,88 ± 3,49 ^{ab}	0,98 ± 0,7 ^{ab}	40	2,25	2,2 ± 0,25 ^b
Valor de P	0,74	-	0,004	0,004	-	0,310	0,002

Os índices (^a) e (^b), representam a diferença das médias (das colunas) determinada por teste Tukey ($p < 0,05$). DP=Desvio Padrão; NC=não calculado.

CONCLUSÕES

- O gene da Hsp70 de *E. tenella* foi clonado em *E. coli* TOP10 que expressou uma proteína recombinante de aproximadamente 23 KDa em altas concentrações;
- A proteína rHsp70 promoveu uma proteção parcial nas aves desafiadas, em relação aos controles desafiado e não desafiado;

APÊNDICES

APÊNDICE A
LISTA DE REAGENTES

1. Acetona (C_3H_6O)
2. Ácido cítrico
3. Ácido clorídrico (HCl)
4. Ácido etilenodiamino tetra-acético – EDTA ($C_{10}H_{16}N_2O_8$)
5. Ácido taurodeoxicolato
6. Azul de tripan
7. Bicarbonato de Sódio ($NaHCO_3$)
8. Carbonato de Sódio (Na_2CO_3)
9. Cloreto de potássio (KCl)
10. Cloreto de Sódio (NaCl)
11. Concavalina A
12. Dicromato de Potássio ($K_2Cr_2O_7$)
13. Dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4)
14. Extrato de saponinas de *Quillaja saponaria* - Quil A[®]
15. Fosfato disódio heptaidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$)
16. Fosfato dissódico dodecahidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)
17. H₂O destilada
18. Heparina
19. Hidróxido de sódio (NaOH)
20. Hipoclorito de Sódio (NaOCl)
21. L – Glutamina
22. Leite em pó desnatado - Molico
23. Monolaurato de polioxietileno sorbitano - Tween 20
24. Orthophenilenediamino - OPD
25. Penicilina e estreptomicina
26. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)
27. Piruvato de sódio
28. RPMI 1640 médio
29. Sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$)
30. Soro de galinha 0,6%
31. Tripsina

APÊNDICE B
SOLUÇÕES E TAMPÕES

- **TESTE IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO (GARCIA et al., 2006; 2008)**
 - **Tampão de sensibilização (0,05 M Carbonato/Bicarbonato pH 9,6)**

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
H ₂ O destilada q.s.p.....	1000 ml
 - **Tampão de bloqueio**

Tampão de sensibilização + 5% de leite em pó desnatado
 - **PBS-Tween 20 (pH 7,4)**

NaCl.....	8,0 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,9 g
KCl.....	0,2 g
Tween 20.....	0,5 ml
H ₂ O destilada q.s.p.....	1000 ml
 - **Substrato cromógeno**

Tampão do substrato cromógeno	100 ml
- 0,1M Ácido Cítrico (21 g/litro = 0,1M)	1,026 g
- H ₂ O destilada q.s.p.....	48,6 ml
- 0,2M Fosfato (28 g Na ₂ HPO ₄ /litro = 0,2M)	1,439 g
- H ₂ O destilada q.s.p.....	51,4 ml
OPD.....	40 mg
H ₂ O ₂ PA 30%.....	40 µl

- **PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO (BREED et al., 1996; 1997 e GARCIA et al., 2008)**
 - **RPMI completo**
 - 2 mM glutamina
 - 50 μ M 2-mercaptoetanol
 - 100 U/mL penicilina/estreptomicina
 - 10% soro fetal bovino inativado
 - **Azul de Tripán 0,1%**
 - Azul de tripan..... 1 mg
 - Água destilada q.s.p 10 ml

- **DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO BRADFORD (BRADFORD, 1976)**
 - **Corante**
 - Brilliant Blue..... 25 mg
 - Etanol 95%..... 12 ml
 - Ácido orto-fostórico 85% 25 ml
 - Água bidestilada q.s.p 250 ml
 - Obs.: Filtre em papel de filtro.
 - **Preparo do Soro Albumina Bovina (SAB)**
 - SAB..... 6 mg
 - NaCl 0,9%..... 10 ml
 - **Dosagem de proteínas solúveis**
 - Proteínas..... 50 μ l
 - Corante..... 1950 μ l

- **EXCISTAÇÃO DE ESPOROZOÍTOS**
 - **Solução para excistação de esporozoítos**
 - Ácido taurodeoxicolato 0,25%
 - Tripsina 0,25%
 - Ácido biliar 0,25%

APÊNDICE C PROTOCOLO DE TÉCNICAS

1. Extração de DNA de *Eimeria* spp.

01. Extração de DNA de *Eimeria* spp. a partir dos esporocistos, que podem ser obtidos por sonicação dos oocistos, através de pérolas de vidro ou gral com pistilo.
02. Para 300 µl de amostra adicionar 30 µl de SDS 10% (1% [] final) e 15 µl de proteinase K (1 mg/mL [] final). Manter em banho-maria 56°C por 1h (mexer gentilmente de 20 – 20 minutos).
03. Adicionar 300 µl de fenol (mexer gentilmente).
04. Centrifugar 13.000 g por 5', após colher o sobrenadante e transferir para outro microtubo.
05. Adicionar 300 µl de clorofórmio/fenol/álcool isoamílico (proporção 24:25:1) e agitar gentilmente.
06. Centrifugar 13.000 g por 5', colher 250 µl do sobrenadante e transferir para outro microtubo (novo).
07. Acetato de amônia (AA) na concentração de 10M
➤ A mistura da solução de AA com a amostra deverá ter uma concentração final de 2,5M, portanto:

$$C_{(AA)} \times V_{(AA)} = C_{final} \times V_{final}$$

$$10M \times V_{(AA)} = 2,5M \times (250 \mu\text{l (amostra)} + V_{(AA)})$$

$$V_{(AA)} = 83,33 \mu\text{l}$$

08. Adicionar 83,33 µl de AA e 780 µl de álcool (etanol) 100%, mexer gentilmente e colocar na geladeira (+ gelo) por 30'
09. Centrifugar 13.000 g por 15' (descartar o sobrenadante)
10. Adicionar etanol 70% (1 mL)
11. Centrifugar 13.000 g por 15' (descartar o sobrenadante)
12. Secar o pellet com o tubo deitado ou invertido sobre um papel toalha.
13. Adicionar 50 µl TE → 24 h a 4°C na geladeira, se > 24 h a -20 no freezer.

a) Soluções:

1. Proteinase K

Solução de reconstituição (20mL)

- | | | |
|---|-----------|---------|
| 1. Tris HCl pH 7,5 (PM. 121,14)..... | 10mM..... | 0,0242g |
| 2. CaCl ₂ .2H ₂ O (PM. 147,02)..... | 20mM..... | 0,0588g |
| CaCl ₂ (PM. 111,02)..... | 20mM..... | 0,0444g |
| 3. H ₂ O (miliQ) q.s.p .. | | 10mL |
| 4. Glicerol..... | | 10mL |

Solução da proteinase K (1mL)

- | | |
|------------------------------------|------|
| 1. Solução de reconstituição | 1mL |
| 2. Proteinase K..... | 23mg |

Obs.: no protocolo de extração de DNA são utilizados 300 µl de fenol + 30 µl de SDS + 15 µl da solução de Proteinase K totalizando 345µl. A [] final de PK na solução é de 1mg/mL.

Portanto:

1mg de PK 1000µl
 X = **0,345 mg de PK** 345 µl

Logo deverá ter 0,345mg de PK em 15 µl da solução

0,345mg de PK 15 µl
 X = **23mg de PK** 1000µl de solução de uso

1. Tris-EDTA (TE) pH 7,2 – 7,5

Tris-HCl 10mM	0,0121 g	0,0606 g	0,1212 g
EDTA 1mM.....	0,0037 g	0,0186 g	0,0372 g
Água miliQ q.s.p.....	10mL	50mL	100mL

3. Amplificação de fragmentos de DNA da espécie *Eimeria* spp. pela PCR (Kit Invitrogen)

a) Preparo dos Primers (oligonucleotídeos)

1. Solução mãe:

1. Centrifugar os primers por 30 segundos
2. Diluir os oligonucleotídeos com água miliQ para ter uma solução final com 100 picomols (obs.: 1nmol = 1000 picomol)

Cálculo:

$$C_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}} = C_{\text{final}} \times V_{\text{final}}$$

$$(C_{\text{inicial}} \times 1000) \times 1 \mu\text{l} = 100 \text{ picomols} \times V_{\text{final}}$$

$$V_{\text{final}} = C_{\text{inicial}} \times 1000/100 \text{ picomols}$$

$$V_{\text{final}} = C_{\text{inicial}} \times 10$$

1. Solução de uso:

1. Diluir a solução mãe de oligonucleotídeos com água miliQ
2. Para o preparo do **primers foward e reverse separados** cada solução terá 20 picomols, sendo:

$$C_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}} = C_{\text{final}} \times V_{\text{final}}$$

$$100\text{pmols} \times V_{\text{inicial}} = 20\text{pmol} \times 100\mu\text{l}$$

$$V_{\text{inicial}} = 20\mu\text{l}$$

Portanto, deve-se diluir 20μl de cada solução mãe em 80μl de água miliQ

3. Para o preparo do **primers foward e reverse juntos** a [] final da solução de uso será de 20 picomols, sendo:

$$100\text{pmols} \times V_{\text{inicial}} = 20\text{pmol} \times 100\mu\text{l}$$

$V_{\text{inicial}} = 20\mu\text{l}$, sendo 10μl do primer forward + 10μl do primer e completar com água miliQ para 100μl.

a) PCR para gênero de *Eimeria* spp

Prime SAG1 (Forward): 5' - ACGTCTGTTTCAGTGTCT -3'

Primer SAG1 (Reverse): 5' - AAATTCAGCGGGTAACCTCG - 3'

1. Receita:

Mix 2 x [] 1,5mM de MgCl ₂	12,50 μl
DNA molde (pode ser diluído).....	1 a 5,00 μl
Primers ww2 + ww4r ([] final 1,6pmol).....	2,00 μl
Ou Primer ww2 ([] final 0,8pmol).....	1,00 μl
Primer ww4r ([] final 0,8pmol).....	1,00 μl
Taq polimerase	0,25 μl
H ₂ O miliQ q.s.p.	25 μl

2. Programa termociclador

1. 94°C 5'
2. 95°C 1'
3. 55°C 1'
4. 72°C 1'
5. Retornar ao passo 2 por 34x
6. 72°C 5'
7. 4°C ∞

Obs.: Apresenta como resultado uma banda de 550 pb. Amplifica banda única.

b) PCR para o gene HSP70 de *Eimeria* spp

Primer Hsp70 (Forward): 5' – GAGAAAGAAGACGGACGCAC – 3'

Primer Hsp70 (Reverse): 5' – CTGATACACCTTGATGCCCCAC – 3'

1. Receita:

Mix 2 x [] 1,5mM de MgCl ₂	12,50 µl
DNA molde (1:100).....	1 a 5,00 µl
Primers F + R.....	2,00 µl
Taq polimerase	0,25 µl
BSA 100x	0,25 µl
H ₂ O miliQ q.s.p.	25,00 µl

2. Programa termociclador

1. 94°C 5'
2. 95°C 1'
3. 60°C 45''
4. 72°C 1'
5. Retornar ao passo 2 por 34x
6. 72°C 15'
7. 4°C ∞

Obs.: Apresenta como resultado uma banda de 768pb. O tempo de extensão deve ser de 7 a 30 minutos para acrescentar uma adenina na porção 3' do produto da PCR. Este produto foi utilizado para clonagem no vetor pTrcHis2 TOPO.

4. Extração de RNA de *E. tenella* pelo TRIZOL® a partir de tecido cecal (CAT. 15596-018)

1. Após fazer a eutanásia de uma ave no 6º dia pós-inoculação *E. tenella*, retira-se o ceco, faz-se a lavagem das fezes com água miliQ ou PBS.
2. Com uma lâmina nova para microscopia faz-se o raspado da mucosa contendo merontes e outros estágios do parasita.
3. Passar o raspado para um microtubo de 1,5mL e congelar no freezer -80°C ou usar imediatamente.

FASE DE HOMOGENEIZAÇÃO

4. Utilizar 50 a 100mg de tecido homogeneizado em 1 ml de reagente Trizol.
 - Misturar bem. Alguns protocolos sugerem passar o lisado em seringa com agulha por 10 vezes.
5. Centrifugar a 12.000xg por 10 minutos a 4°C.
6. Remover o sobrenadante contendo o RNA.
 - Nesta fase a amostra pode ser guardada a -80°C caso seja necessário.

FASE DE SEPARAÇÃO

7. Incubar a amostra homogeneizada e centrifugada por 5 minutos em temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas.
8. Adicionar 0,2mL de clorofórmio para cada 1mL de TRIZOL usado na homogeneização.
9. Fechar bem o tubo e misturar vigorosamente com as mãos por 15 segundos.
10. Incubar por 2 a 3 minutos em temperatura ambiente.
11. Centrifugar a amostra a 12.000xg por 15 minutos a 4°C.
 - A mistura irá separar em 3 fases, uma fase de baixo contendo clorofórmio na de cor vermelha, uma interfase e uma aquosa superior translúcida, a qual representa aproximadamente 50% do volume total, onde ficará o RNA.
12. Remover a fase aquosa evitando pipetar a interfase e colocar em um novo microtubo para prosseguir a fase de isolamento do RNA.

ISOLAMENTO DO RNA

- Tomar os cuidados necessários para evitar contaminação por RNase.

PRECIPITAÇÃO DO RNA

13. Adicionar 0,5mL de isopropanol 100% na fase aquosa para cada 1mL de TRIZOL usado na homogeneização.
14. Incubar em temperatura ambiente por 10 minutos.
15. Centrifugar a 12.000xg por 10 minutos a 4°C.

LAVAGEM DO RNA

16. Remover o sobrenadante do microtubo e deixar apenas o pellet que muitas vezes pode não ser visível.
17. Lavar o pellet com 1mL de etanol 75% para cada 1mL de TRIZOL utilizado na fase de homogeneização.
 - O RNA pode ser armazenado em etanol 75% por pelo menos 1 ano a -20°C ou 1 semana a 4°C.
18. Utilize o vortex rapidamente para misturar e centrifugue a 7500xg por 5 minutos a 4°C. Descarte o sobrenadante.
19. Secar o pellet. Não permitir que ele seque completamente, sob risco de diminuir a solubilidade.

SUSPENSÃO DO RNA

20. Ressuspenda o pellet de RNA em água livre de RNase ou solução 0,5% de SDS, através de várias passagens da solução na pipeta.
 - Não dissolver em SDS se for realizar reações enzimáticas.
21. Incubar a 55-60°C por 10 a 15 minutos, em seguida pode ser utilizado ou armazenado a -70°C.

5. Purificação de DNA do gel de agarose (PureLink Quick Gel Extraction Kit – Invitrogen – K2100-12)

1. Objetivo: obtenção de bandas específicas em gel com mais de uma banda
2. Regular o banho-maria para 50°C
3. Retirar o pedaço de gel contendo a banda desejada utilizando transluminador e óculos protetor. Pode-se recortar fragmentos de vários géis até o máximo de 400mg.
4. Pesar o pedaço em balança com pelo menos 3 casas.
5. Para géis com $[] \leq 2,0\%$ adicionar 3 volumes do tampão de solubilização (L3) para 1 vol. de gel em microtubo de 1,5mL novo. Ex.: 400mg de gel para 1,2 mL do L3.
6. Para géis com $[] \geq 2,0\%$ adicionar 6 volumes do L3 para 1 vol. de gel em tubos de 5 mL. Ex.: 400mg de gel para 2,4mL do L3.
7. Incubar em banho-maria a 50°C por pelo menos 10 minutos e inverter o tubo a cada 3 minutos.
8. Incubar por mais 5 minutos após dissolução.
9. Para aumentar a qualidade da recuperação de DNA adiciona-se o mesmo volume do gel de isopropanol.
10. Purificar por centrifugação ou a vácuo.
11. Centrifugação:
12. Colocar a coluna no tubo de lavagem e pipetar o gel com DNA no centro da coluna. Centrifugar a 12000g por 1 minuto.
13. Descartar o conteúdo do tubo e recolocar a coluna no tubo para adicionar 500-700 µls de tampão de lavagem (W1) com etanol na coluna.
14. Centrifugar por 1 minuto a 12000g. Descarte o conteúdo do tubo e recoloca a coluna no lugar.
15. Descarte o tubo de lavagem e recoloca a coluna dentro do tubo de recuperação.
16. Adicionar 50µls do tampão de eluição (E5) no centro da coluna e incubar por 1 minuto na temperatura da sala.
17. Centrifugar 12000g por 1 minuto, descartar a coluna e guardar o tubo de recuperação com DNA purificado.
18. Armazenar a 4°C por até 24 horas e -20°C para um tempo maior.