



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GUILHERME FELIPPELLI MARTINS

**AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DA PROTEÍNA
rHSP70 DE *EIMERIA TENELLA* EM FRANGOS DE CORTE
POR VIA OCULAR**

Londrina
2015

GUILHERME FELIPPELLI MARTINS

**AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DA PROTEÍNA
rHSP70 DE *EIMERIA TENELLA* EM FRANGOS DE CORTE
POR VIA OCULAR**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Odilon Vidotto

Londrina
2015

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M386a Martins, Guilherme Felippelli.
Avaliação da imunogenicidade da proteína rHSP70 de *Eimeria tenella* em frangos de corte por via ocular / Guilherme Felippelli Martins. – Londrina, 2015.
80 f. : il.

Orientador: Odilon Vidotto.
Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2015.
Inclui bibliografia.

1. Coccidiose em ave – Teses. 2. Frango de corte – Doenças – Teses. 3. Eimeria – Teses. 4. Frango de corte – Imunologia – Teses. 5. Vacinas – Teses. I. Vidotto, Odilon. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:636.5

GUILHERME FELIPPELLI MARTINS

**AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DA PROTEÍNA rHSP70 DE
EIMERIA TENELLA EM FRANGOS DE CORTE POR VIA OCULAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Odilon Vidotto
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. João Luis Garcia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. José da Silva G. Júnior
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Alexey L. G. Bogado
Universidade Estadual do Norte do Paraná –
UNOPAR

Prof. Dr. Ademir B. L. Pereira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 10 de abril de 2015.

Este estudo foi realizado no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias, Laboratório de Helmintologia 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 de título de Doutor em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob orientação do Prof. Dr. Odilon Vidotto.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto as 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**

Dedico

Aos meus pais, avó, namorada e amigos pelo
carinho e apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Odilon Vidotto que pela orientação e confiança.

Ao Prof. Dr. João Luis Garcia pela orientação durante o projeto.

Ao Prof. Dr. José da Silva Guimarães Júnior pela orientação e conselhos no mestrado.

A todos os funcionários que ajudaram de forma direta e indiretamente na realização do projeto, em especial à Dr^a. Elizabete, Aldair, Dalva e Pedro.

A todos os professores da graduação e pós-graduação que de alguma forma contribuíram no meu aprendizado.

Ao ex-doutorando e agora Prof. Dr. Alexey pela ajuda, conhecimento e paciência.

Aos estagiários, residentes e demais pós-graduandos pela colaboração e disposição durante tempo que estavam presentes.

A todos os amigos de Londrina, Guarujá e São Paulo.

A minha namorada Flávia pelo amor, compreensão, paciência e carinho.

Ao meu sogro Dorotheu e sogra Maria pelo carinho e atenção.

Aos meus irmãos Fábio e Renata por toda a força e amor.

Aos meus pais Regina e Luiz pelo amor, apoio, confiança e incentivo mesmo tão longe.

A minha avó Ana Diva pelo amor e apoio.

Em especial aos meus avós João, Maria e Carminé, que mesmo não estando presentes tiveram contribuição essencial na pessoa que sou hoje.

Epígrafe

“You can't always get what you want. But if you try sometimes, you might find you get what you need.....”

Mick Jagger/ Keith Richards

MARTINS, Guilherme Felippelli. Avaliação da imunogenicidade da proteína rHSP70 de *Eimeria tenella* em frangos de corte por via ocular. 2015. 80 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina. 2015.

RESUMO

A coccidiose aviária é uma doença parasitária causada por protozoários do Filo Apicomplexa, do gênero *Eimeria*. Diversos antígenos recombinantes vem sendo testados em vacinas sob condições experimentais apresentando resultados promissores. A HSP70 é uma proteína que apresenta múltiplas funções em diversas fases do ciclo de vida deste parasito sendo considerada por diversos autores como promissora para utilização como imunógeno devido ao seu potencial imunogênico. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo produzir a proteína recombinante rHSP70 de *E. tenella*, e avaliar a sua proteção contra desafio homólogo em frangos de corte. O segmento de DNA, da proteína HSP70 foi obtido pela técnica de PCR utilizando *primers* específicos para o gene total. Estes segmentos foram incorporados ao vetor de expressão de proteínas pTrcHis2 (*Invitrogen*) para produção dos plasmídeos recombinantes e posteriormente inseridos em *E. coli* TOP10 competente quimicamente para obtenção e purificação das proteínas recombinantes. Foram utilizadas 80 aves, não vacinadas contra coccidiose, distribuídas em quatro tratamentos: G1 - rHSP70 mais toxina colérica (n=20); G2 – soro albumina bovina e toxina colérica (n=20), G3 – somente PBS (controle positivo, n=20) e G4 - somente PBS (controle negativo, n=20). Os tratamentos foram executados por via ocular aos dias 7 e 14 do experimento. No dia 21, todos os tratamentos foram desafiados com 5×10^4 oocistos esporulados de *E. tenella*. Foram avaliados o ganho de peso, conversão alimentar, eliminação de oocistos, fecundidade e anticorpos anti-rHSP70. A expressão do gene *hsp70* permitiu a produção de uma proteína rHSP70 de aproximadamente 23kDa. Quanto ao ganho de peso G1 apresentou um aumento de 2,7% em relação a G4, enquanto G3 apresentou redução de 2,22% neste parâmetro. A titulação de anticorpos demonstrou uma intensa resposta humoral em G1 no pós-desafio. Apesar da maior eliminação de oocistos em G1, não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre os grupos desafiados ($p=0,0162$). Da mesma forma não foi observado diferença estatística entre os grupos desafiados no quesito escore de lesão ($p=0,0137$). Os tratamentos não promoveram a melhora nos parâmetros estudados à exceção dos níveis de anticorpos que mostraram altos títulos pós desafio, sugerindo tal proteína como promotora da imunidade humoral.

Palavras chaves: *Eimeria tenella*. HSP70. Proteínas recombinantes. Coccidiose. Vacinas.

MARTINS, Guilherme Felippelli. *Eimeria tenella*: Evaluation of immunogenicity of *Eimeria tenella* rHSP70 protein in broilers via ocular. 2015. 80 p. Thesis (Doctorate in Animal Science) - Londrina State University. 2015.

ABSTRACT

Avian coccidiosis is a parasitic disease caused by protozoa of the Phylum Apicomplexa, genus *Eimeria*. Several recombinant antigens in vaccines are being tested under experimental conditions shown promising results. HSP70 is a protein that has the multiple functions at various stages of the life cycle of this parasite is considered by many authors as promising for use as an immunogen because of its immunogenic potential. Thus, this study aimed to produce the recombinant protein of *E. tenella* rHSP70, and assess their protection against homologous challenge in broilers. The DNA segment, HSP70 protein was obtained by PCR using primers specific for the full gene. These segments were incorporated into pTrcHis2 protein expression vector (Invitrogen) for production of recombinant plasmids and then inserted into *E. coli* TOP10 chemically competent for collection and purification of recombinant proteins. We used 80 birds not vaccinated against coccidiosis, distributed in four treatments: G1 - rHSP70 more cholera toxin (n = 20); G2 - bovine serum albumin, and cholera toxin (n = 20), G3 - PBS only (positive control, n = 20) and G4 - PBS only (negative control, n = 20). The treatments were performed by ocular route at days 7 and 14 of the experiment. On day 21, all treatments were challenged with 5×10^4 sporulated oocysts of *E. tenella*. We evaluated weight gain, feed conversion, elimination of oocysts, fertility and anti-rHSP70 antibodies. The expression of the hsp70 gene allowed the production of a protein of approximately 23kDa rHSP70. As for the weight gain G1 increased by 2.7% compared to G4, while G3 declined by 2.22% in this parameter. The antibody titration showed a strong humoral response G1 post-challenge. Despite the increased elimination of oocysts in G1, there were no statistically significant differences between the challenged groups ($p=0,0162$). Similarly was not statistical difference between the challenged groups in the item injury score ($p=0,0137$). The treatments did not promote the improvement in the parameters studied except for levels of antibodies that showed high post-competition titles, suggesting this protein as a promoter of humoral immunity.

Key words: *Eimeria tenella*. HSP70. Recombinant proteins. Coccidiosis. Vaccines.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO: Avaliação da imunogenicidade da proteína rHSP70 de *Eimeria tenella* em frangos de corte por via ocular.

Tabela 1 – Diferentes parâmetros associados a proteção com base no ganho de peso, índice de conversão alimentar, eliminação de oocistos, fecundidade e escore de lesão cecal54

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO: Avaliação da imunogenicidade da proteína rHSP70 de *Eimeria tenella* em frangos de corte pela via ocular.

- Figura 1** – Produtos amplificados através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) respectivos aos gene HSP70 - Gel de Agarose a 1,5% (SYBER GREEN®)51
- Figura 2** – Proteína recombinante rHSP70 purificada em condições desnaturantes - Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%52
- Figura 3** – Titulação de anticorpos (IgY) anti-rHSP70 nos diferentes tratamentos nos dias de pré (21° dia de experimento) e pós desafio (21° dia de experimento)53

SUMÁRIO

REVISÃO DE LITERATURA	13
1 Introdução	14
2 Aspectos imunológicos na infecção por <i>Eimeria spp.</i>	15
3 Vacinas de proteínas recombinantes e de DNA recombinante	16
3.1.1 Proteínas de micronemas	18
3.1.2 Proteínas de roptrias	20
3.1.3 Proteínas de choque térmico (HSP´s)	21
3.1.4 Proteínas imunomapeadas (IMP´s)	22
5 Conclusão	23
REFERÊNCIAS.....	24
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo Geral	31
2.2 Objetivos Específicos	31
ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO – “Avaliação da imunogenicidade da proteína rHSP70 de <i>Eimeria tenella</i> em frangos de corte por via ocular”	32
Resumo	33
Abstract	34
1 INTRODUÇÃO	35
2 MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1 Local	36
2.2 Produção de oocistos para obtenção de esporozoítos e desafio homólogo	36
2.3 Preparo da suspensão de esporozoítos	37
2.4 Produção das Proteínas Recombinantes	37
2.4.1 Construção dos plasmídeos de expressão	37
2.4.2 Clonagem do gene <i>hsp70</i>, expressão em <i>Escherichia coli</i> e purificação	38
2.5 Produção de anticorpos policlonais	39
2.6 Delineamento Experimental e Manejo	39
2.7 Colheita de amostras	40

2.8	<i>Teste Imunoenzimático (ELISA)</i>	40
2.9	<i>Análise Estatística</i>	41
3	RESULTADOS	41
3.1	<i>Produção de rHSP70</i>	41
3.2	<i>Avaliações do ganho de peso médio e índice de conversão alimentar (ICA)</i>	42
3.3	<i>Titulação de anticorpos anti-rHSP70</i>	42
3.4	<i>Avaliação da eliminação de oocistos e escore de lesão</i>	42
4	DISCUSSÃO	43
5	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	47
	APÊNDICE	55

	ARTIGO PUBLICADO – “O uso de vacinas no controle da coccidiose aviária”	62
	Resumo	62
	Abstract	63
	Introdução	64
	<i>Eimeria spp</i>	65
	Aspectos imunológicos das aves e vacinas	66
	Vacinas vivas	68
	Vacinas inativadas	69
	Vacinas de proteínas e DNA recombinantes	70
	<i>Proteínas intracelulares secretórias e estruturais</i>	71
	<i>Proteínas superficiais estruturais</i>	72
	<i>DNA recombinante</i>	73
	Adjuvantes	74
	Conclusão	74
	Referências	76

Revisão de literatura

Proteínas recombinantes de interesse na imunização de frangos contra coccidiose aviária.

Resumo: A eimeriose em frangos de corte é um dos problemas sanitários e econômicos mais proeminentes atualmente. O controle desta enfermidade é realizado através do uso de drogas anticoccidianas na alimentação animal, que quando utilizada de forma indiscriminada, fato observado nas últimas décadas, pode acarretar em sérios problemas de resistência do parasito a tais fármacos. Além disso, principalmente devido a possibilidade de resíduos no produto final, o atual mercado consumidor pressiona os órgãos regulatórios pela retirada de tais drogas da produção animal. O uso de vacinas vivas como alternativa viável para o controle da coccidiose, apesar de promover a proteção, ainda é discreto, possivelmente devido a problemas como alto custo de produção, possível reversão de atenuação, podendo levar a ocorrência de surtos. Tendo em vista tais problemas, a comunidade científica busca alternativas viáveis nos últimos anos, sendo as vacinas recombinantes e de DNA recombinantes interessantes alternativas. Porém, apesar das diversas proteínas descobertas com potencial imunogênico e dos resultados promissores em condições experimentais, seu uso na produção de frangos de corte é ainda mais discreto que as vacinas vivas.

Palavras chaves: *Eimeria tenella*, frangos, proteínas recombinantes, coccidiose, vacinas.

Abstract: The eimeriosis in broilers is one of the health and economic problems currently more prominent. The control of this disease is accomplished through the use of anticoccidial drugs in feed, which when used indiscriminately, a fact observed in recent decades can lead to serious parasite resistance problems to these drugs. In addition, mainly due to the possibility of residues in the final product, the current consumer market pressing regulatory bodies for the withdrawal of such drugs in livestock production. The use of live vaccines as a viable alternative for the control of coccidiosis, although promoting the protection, it is still discrete, possibly due to problems such as high production costs, possible reversal of attenuation, and may lead to outbreaks. In view of such problems, the scientific community search viable alternative in recent years, with the recombinant and recombinant DNA interesting alternative vaccines. However, despite the various discoveries proteins with immunogenic potential and promising results under experimental conditions, their use in the production of broilers is more discrete than live vaccines.

Key words: *Eimeria tenella*, chickens, recombinant proteins, coccidiosis, vaccines.

1 Introdução

O parasitismo intestinal é a maior causa de stress o qual acarreta na redução do desempenho e eficiência produtiva em pecuária e criação de frango. A coccidiose é uma infecção intestinal causada por um protozoário intracelular pertencente ao gênero *Eimeria* (YUN et al., 2000). Os principais problemas associados a coccidiose são diarréia, diminuição do ganho de peso, elevada conversão alimentar e, em alguns casos, mortalidade. (MARTINS et al., 2012).

A coccidiose aviária é um problema mundial com perdas econômicas na indústria aviária estimadas em US\$ 3 bilhões/ano (DALLOU; LILLEHOJ., 2006). Segundo Williams (1999), estima-se que aproximadamente 80% das perdas estejam relacionadas a mortalidade, ganho de peso e conversão alimentar e, em torno de 17% a quimioprofilaxia e terapia.

A resistência às drogas anticoccidianas permanece como um grande obstáculo na indústria aviária. Para prevenir tal problema diversas drogas e diferentes métodos de administração foram testados porém esta atitude resultou no aumento do custo de produção para a indústria aviária (ZULPO et al., 2007). Frente a isso, a indústria farmacêutica veterinária interrompeu o desenvolvimento de novas drogas anticoccidianas (DINIZ et al., 2009). Soma-se a este fato a mudança comportamental da população consumidora, que busca e exige, produtos isentos de resíduos químicos (BOGADO, 2009), o que estimulou a busca por métodos alternativos para o controle desta enfermidade (MARTINS et al., 2012).

Há mais de um século que a vacinação foi comprovada como o método mais eficiente no controle de doenças infecciosas. Existem diversos tipos de vacinas comerciais e em fase de pesquisa para coccidiose aviária, porém as vivas e atenuadas são as mais comercializadas. Apesar disso seu uso em avicultura de corte é discreto, possivelmente devido ao custo elevado, menor eficácia frente aos anticoccidianos e riscos de surtos ou reversão da atenuação (MARTINS, 2011). Devido a isto existem diversos estudos com vacinas de DNA recombinante e proteínas recombinantes por utilizarem frações do organismo não havendo assim o risco de infecção (BOGADO, 2013).

Nesta revisão serão abordadas algumas das principais proteínas utilizadas por diversos pesquisadores, bem como os atuais resultados publicados.

2 Aspectos imunológicos na infecção por *Eimeria* spp.

O gênero *Eimeria* possui sete espécies de importância em avicultura: *Eimeria acervulina*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria mitis*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria maxima*, *Eimeria tenella* e *Eimeria praecox* (MARTINS, et al., 2012; MA et al., 2013; PINHEIRO et al, 2014; YOU, 2014). Todas espécies possuem tropismo pelo trato intestinal (do duodeno ao reto), possuindo, cada uma delas, patogenicidade e especificidade distintas (YOU, 2014).

Os animais infectados eliminam oocistos não esporulados nas fezes, os quais sofrem esporulação no meio ambiente sob condições ideais de temperatura, umidade e oxigênio, tornando-se esporulados e, conseqüentemente, infectantes. Esses oocistos esporulados, quando ingeridos por uma ave susceptível, liberam os esporozoítos acarretando no desenvolvimento do ciclo assexuado seguido pelo ciclo sexuado dentro da mucosa intestinal. Devido a este fato pode-se observar quadros de diarreia que podem ser mais intensos dependendo da porção do intestino e grau de invasividade da espécie de *Eimeria* envolvida, podendo levar os animais a quadros de diarreia com sangue e, em alguns casos, a morte (MATSUBAYASHI et al., 2013).

As aves possuem uma série de particularidades em seu sistema imunológico, anatômicos e funcionais, que as diferenciam dos mamíferos. Os órgãos do sistema imunológico são divididos em primários (timo e a bolsa cloacal) e secundários (glândula de Harder, baço, tonsilas cecais e Placas de Peyer) responsáveis pela migração ou agrupamento de células, formando sítios de amadurecimento (SANTIN; MORAES, 2014). Devido ao ciclo biológico da Eimeriose compreender fases intracelular, extracelular, sexuada e assexuada, é notório a complexidade da resposta imune assim como o envolvimento da imunidade específica e não específica, além da imunidade humoral e celular (YUN et al., 2000). Apesar dessa resposta multifatorial e complexa, poucas dessas ações do sistema imune são efetivamente protetoras, sendo esta tarefa executada através das respostas imunomediadas por células, mais especificamente linfócitos T CD4+, principalmente aqueles que expressam receptores α , β , e interferon gama (IFN- γ) (SHIRLEY et al., 2007). Pelo fato da infecção ocorrer no intestino cabe ao GALT (tecido linfóide associado ao intestino) a primeira linha de defesa contra este parasito,

executando o reconhecimento, processamento e apresentação de antígenos, produção de anticorpos (IgA) e ativação da imunidade mediada por células (LILLEHOJ, 2000).

Apesar do entendimento atual sobre a importância da resposta imune celular como promotora de proteção contra desafios naturais e experimentais por cepas de diferentes espécies de *Eimeria*, pouco se sabe sobre os mecanismos exatos envolvidos nesta situação (KLOTZ, 2007). No entanto, é de conhecimento que aves convalescentes pós desafio desenvolvem imunidade efetiva protetora contra a espécie de *Eimeria* envolvida, não havendo imunidade cruzada entre as diferentes espécies (YUN et al., 2000).

A complexa interação entre as células imunoefetoras e suas citocinas e quimiocinas, o epitélio intestinal e a microbiota intestinal, determina a susceptibilidade do hospedeiro ou resistência a patógenos infecciosos. Um dos atuais desafios da pesquisa com coccidiose aviária é identificar a base celular e molecular de imunidade espécie-específica e um potencial mecanismo imunológico protetor-cruzado que possa conferir proteção contra várias espécies de *Eimeria*. Além disso, o papel de fatores solúveis que fazem a mediação das respostas inflamatórias locais requer caracterização adicional, sobretudo tendo em conta as consequências negativas da inflamação não controlada sobre a saúde do intestino e a produtividade de aves de produção (MIN et al., 2013).

Embora tradicionalmente considerado como um componente da imunidade adaptativa, as citocinas relacionadas à Th17 são agora reconhecidas como parte da resposta que se desenvolve durante as fases iniciais de ativação do sistema imune. Uma vez segregada, estas citocinas, e outras, regulam as interações entre os epitélios da mucosa e dos seus linfócitos associados para erradicar agentes patogênicos invasores, e para restaurar a homeostase (MIN et al., 2013).

3 Vacinas de proteínas recombinantes e de DNA recombinante

Os protozoários são responsáveis por sérias doenças em humanos e em diversas espécies de animais domésticos. A vacinação é o método de intervenção de eleição nessas infecções, porém, apesar de vários anos de esforços dos

pesquisadores, poucas vacinas efetivas são comercializadas atualmente (BLAKE et al., 2011).

A maioria das vacinas comerciais para coccidiose atualmente envolvem parasitas vivos em baixa dose ou cepas atenuadas, mas até recentemente seu uso era restrito a aves na produção de ovos e em matrizes de reposição (CHAPMAN; JEFFERS, 2014). A grande desvantagem das vacinas vivas é possuir uma vida útil curta e custos de produção elevados, principalmente quando trata-se de vacinas atenuadas, além de, em alguns casos, proporcionarem diminuição de ganho de peso dos animais. Deve-se levar em consideração que as vacinas vivas são produzidas após uma ou sucessivas passagens em aves, o que tem de ser suficiente para produzir oocistos suficientes para imunizar em torno de 40 bilhões de frangos todos os anos (INNES; VERMEULEN, 2006).

Os recentes avanços no sequenciamento do genoma de parasitas e análise de expressão de sequências tag (EST) proporciona uma alternativa, representando uma fonte inestimável para a identificação de possíveis antígenos vacinais (KNOX; REDMOND, 2006). Nos últimos anos foi possível testemunhar o aumento no número do sequenciamento de parasitos devido a moderna tecnologia de sequenciamento de DNA de alto rendimento com o potencial de gerar sequências genômicas completas (FERNADEZ-ROBLEDO; VASTA, 2010).

As aplicações das proteínas recombinantes obtidas de protozoários são amplas, como no desenvolvimento de ferramentas diagnósticas, na produção de imunógenos para vacinação, na análise estrutural e funcional de proteínas críticas dos parasitos, e na produção de drogas antiparasitárias. Apesar disso a produção dessas proteínas possuem alguns problemas, como a escala de produção, a imunogenicidade do produto recombinante e modificações pós-translacionais (KLOTZ et al., 2005; FERNADEZ-ROBLEDO; VASTA, 2010).

A identificação dos antígenos certos para a inclusão em vacinas de subunidades ainda é um problema em organismos complexos. Além disso a resposta imune do hospedeiro não discrimina entre antígenos protetores e não-protetores, dificultando o desenvolvimento de sistemas de defesa efetivos (BLAKE et al., 2011).

3.1.1 Proteínas de micronemas

As organelas micronemas, localizadas na extremidade apical do complexo apical dos protozoários pertencentes ao Filo Apicomplexa, são responsáveis pela produção e armazenamento de diversas proteínas críticas para a motilidade do parasito. Proteínas de micronemas (MIC) importantes estão envolvidas em múltiplas interações entre o parasita e a célula hospedeira, especificamente em relação a motilidade, adesão, reconhecimento e penetração. Relatos recentes sugerem que antígenos recombinantes de micronemas podem promover proteção em frangos contra coccidiose quando usadas como vacinas (QI et al., 2013).

Essas proteínas tem sido utilizada de forma recorrente com resultados promissores na confecção de vacinas recombinantes, como pode-se observar vacinas utilizando proteínas recombinantes de *E. tenella* EtMIC2 (DALLOU et al., 2005), EtMIC1 (SUBRAMANIAN et al., 2008), e antígeno 5401 da região C-terminal de EtMIC4 (DANFORTH et al., 1989; DU; HU; WANG, 2005).

Segundo QI et al (2013), micronemas podem secretar aproximadamente 20 proteínas diferentes na superfície do parasito, sendo que algumas delas possuem importante papel na invasão da célula hospedeira incluindo o complexo MIC4-MIC1-MIC6, o qual possui envolvimento na ligação do parasito a célula hospedeira.

Até o momento nove proteínas de micronemas de *Eimeria* foram reportadas, sendo elas, proteínas de micronemas de 1 a 7 (MIC1 a 7), e antígenos de membrana apical 1 e 2 (AMA 1 e 2). Devido as suas funções no organismo hospedeiro sugere-se que possam ser utilizadas, de forma promissora, como vacinas recombinantes (ZHANG et al., 2014b).

Segundo Moreira (2008), as proteínas anônimas relacionadas a trombospondina (TRAP) são uma família de proteínas secretadas por micronemas de protozoários pertencentes ao Filo Apicomplexa, estando associadas a mobilidade, invasão da célula hospedeira e/ou locomoção. Desta família destaca-se EmTFP250 presente em estágios assexuados de *Eimeria maxima* e fortemente associado a imunidade maternal desenvolvida em pintainhos de corte recém-nascidos (WITCOMBE et al., 2004).

Witcombe et al (2004) avaliaram a imunogenicidade da região C-terminal da proteína EmTFP250 através da imunização de camundongos e frangos com a mesma. Neste estudo observaram uma forte resposta humoral, de IgG, em ambas as espécies animais determinado por ELISA específico. Estes autores sugerem esta proteína como uma potencial candidata a vacina recombinante, porém carece da

avaliação de outros parâmetros importantes, como avaliação de escores de lesão, ganho de peso, eliminação de oocistos, entre outros.

Hoan et al (2014) observaram um aumento nos títulos de IgG, interferon e diversos outros parâmetros utilizando uma vacina de DNA (plasmídeo pVAX1) clonado com o gene AMA 1 de *Eimeria brunetti* em desafio homólogo.

Shi et al (2014), observaram melhora no ganho de peso e diminuição na eliminação de oocistos em frangos imunizados com uma vacina de DNA recombinante EtMIC2 contra desafio homólogo com oocistos de *Eimeria tenella*, porém não houve melhora significativa nas lesões cecais. Em contrapartida, no mesmo estudo, um grupo de frangos imunizado com a mesma vacina associada a interleucina 18 (pVax-EtMIC2-ChIL18) mostrou resultados melhores que os demais grupos. A capacidade de promoção de proteção parcial contra desafio homólogo utilizando a proteína EtMIC2 como imunógeno já havia sido demonstrada anteriormente (SATHISH et al., 2011).

Sathish et al (2012), testaram vacinas compostas por EtMIC1 e EtMIC2 clonando-as em plasmídeo de *Agrobacterium* e realizando a expressão em células de tabaco. Segundo os autores, o uso de plantas na produção de proteínas recombinantes possui um custo benefício melhor que outros vetores de expressão, permite a produção em larga escala, além de eliminar o risco de contaminação com patógenos humanos. Estes autores observaram melhor resposta de anticorpos séricos, ganho de peso e diminuição da eliminação de oocistos em aves imunizadas com vacinas bivalentes, com EtMIC1 e EtMIC2, quando comparadas com estas mesmas proteínas isoladas contra desafio homólogo com oocistos de *Eimeria tenella*. Entretanto, apesar desses resultados, foi observado uma melhor resposta de IFN- γ em aves vacinadas com EtMIC1.

O uso de vetores de expressão alternativos, aos vetores bacterianos, vem sendo testado e não somente em plantas. O uso de uma levedura, *Pichia pastoris*, foi utilizada como vetor de expressão da proteína EtMIC2 e comparada com *Escherichia coli* mostrando resultados mais eficientes quando comparadas no aspecto imunoprotetor. Aparentemente frangos imunizados com proteínas expressas por *Pichia pastoris* foram responsáveis por melhor ganho de peso, melhor estimulação da resposta imune humoral, diminuição da eliminação de oocistos e diminuição do escore de lesão cecal em desafio homólogo contra *Eimeria tenella* (ZHANG et al., 2014a).

Além do uso em diferentes vetores de expressão, as proteínas de micronemas também tem sido associada a outras proteínas recombinantes afim de amplificar a resposta imune. Zhang et al (2012) testou uma vacina recombinante associando EtMIC2 a proteína EtHSP70 obtendo resultados promissores quanto a parâmetros como ganho de peso, soro conversão, produção de interleucinas e interferon, além de diminuição da eliminação de oocistos e escores de lesão no desafio homólogo contra *Eimeria tenella*. Esse mesmo trabalho mostrou a capacidade imunogênica da proteína EtHSP70 atuando como adjuvante quando combinada a outras proteínas recombinantes.

3.1.2 Proteínas de roptrias

As proteínas de Roptrias são cruciais na invasão e sobrevivência de protozoários do Filo Apicomplexa na célula hospedeira. As roptrias são organelas divididas em dois compartimentos, bulbo e "ducto" (neck), que contém duas subpopulações de proteínas: RON (Ropthry Neck Protein), secretadas no início da invasão celular responsável pela junção das membranas do parasito e do hospedeiro, e ROP (Ropthry Protein), produzidas no compartimento bulbar da organela e secretada mais tardiamente durante a formação do vacúolo parasitóforo (OAKES et al., 2013). Proelloks et al (2010), sugerem que as proteínas RON possam formar um complexo com as proteínas AMA1 de micronemas durante o processo de invasão.

Apesar do conhecimento extenso sobre as proteínas de roptrias e seu uso em vacinas em para parasitos do Filo Apicomplexa, como *Toxoplasma gondii*, o seu uso na coccidiose aviária tem-se limitado mais às pesquisas relacionadas com as suas funções e ciclo biológico do parasito, não sendo freqüente a sua utilização como imunógeno (OAKES et al., 2013; PROELLOCKS et al., 2010), apesar de já ter sido utilizada por JENKINS et al (1990).

3.1.3 Proteínas de choque térmico (heat shock proteins - HSP's)

As proteínas de choque térmico (HSP's) são pertencente a uma família extensa de polipeptídeos que conservaram-se ao longo da evolução e apresentam

diversas funções celulares. Estão presentes nas mitocôndrias e citoplasma celular onde participam da biossíntese, transporte, secreção e impedem o "enovelamento" de proteínas produzidas pela célula, sendo denominadas "*chaperonas*" (DUNN et al., 1995). Além disso estas HSP's podem translocar proteínas pela membrana celular, além de proteger proteínas secretadas em condições de stress térmico. Essas proteínas, que possuem grande potencial imunogênico tem sido identificadas em células de diversos organismos vivos que vão de bactérias ao ser humano (LAURENT et al., 1994).

Assim como em diversas células, as HSP's possuem grande importância no desenvolvimento do esquizonte de *Eimeria* e no processo de invasão da célula hospedeira. Neste caso, Péroval et al (2006), demonstraram a importância da Hsp90 como responsável por tais funções.

Shen et al (2012) demonstrou o efeito do anticoccidiano Diclazuril sobre merozoítos de segunda geração de *E. tenella*, o que acarretou na diminuição em aproximadamente 30% na síntese desta proteína. Devido sua já comprovada função no desenvolvimento do esquizonte e na invasão da célula hospedeira, estes autores sugerem esta proteína como alvo promissor na intervenção durante a infecção por *E. tenella*. Apesar deste fato, até o presente momento não foi evidenciado a produção de nenhum artigo científico utilizando esta proteína em vacina recombinante.

Outra HSP importante e anteriormente estudada é a HSP70. Esta proteína é uma chaperona que possui envolvimento crítico na manutenção da homeostase celular, atuando, inclusive, como citocinas no espaço extracelular. As HSP70's encontradas em microrganismos possuem grande imunogenicidade, sendo um potente ativador do sistema imune inato e gerador de imunidade específica contra tumores e vários agentes infecciosos, como protozoários (ZHANG et al., 2012). Segundo Mohamed et al (2003) esta proteína ainda pode atuar como sinalizador de perigo que é reconhecido por células dendríticas e *natural killers* induzindo, assim, a ativação da imunidade inata e adaptativa, inclusive promovendo a transição entre ambas. Cacho et al (2008) demonstram ainda a importância desta proteína na esporulação dos oocistos, durante o processo de formação dos esporocistos e esporozoítos, onde atua junto ao complexo sinaptonemal estabilizando os cromossomos durante sua replicação.

O uso de rHSP70 como imunógeno em vacinas recombinantes mostrou-se promissor, como demonstrado por Zhang et al (2012). Estes autores relataram uma

melhora na imunidade protetora em grupos de frangos vacinados com a proteína EtMIC2 de *E. tenella* contra desafio homólogo. Neste trabalho foi evidenciado a melhora em parâmetros como ganho de peso, escore de lesão cecal, eliminação de oocistos, títulos de anticorpos específicos, além de altos níveis de interleucina 12 (IL-12), interleucina 17 (IL-17) e interferon gama (INF- γ).

3.1.4 Proteínas imunomapeadas (IMP's)

Usando uma combinação da genética do parasito e assinaturas genéticas populacionais, Blake et al (2011) sugeriram que a imunidade contra *Eimeria* tem sido dirigida contra apenas algumas discretas regiões do genoma deste parasito. Sendo assim, estudaram e relataram a identificação de seis regiões genômicas e, dentro de dois desses *loci*, identificaram o que consideraram como verdadeiros antígenos protetores que conferem proteção em vacinas de subunidades. O primeiro deles é o antígeno de membrana apical 1 (AMA1) produzidos nos micronemas o qual já foi citado nesta revisão. O outro trata-se de um gene não caracterizado e denominado proteína imunomapeada 1 (IMP1).

A IMP1 é um antígeno presente em protozoários do Filo Apicomplexa recém-descoberto, sendo isolado pela primeira vez em *E. maxima*, e que ainda possui estrutura e imunogenicidade pouco conhecidos em *E. tenella* (YIN et al., 2013). Esta proteína também foi reconhecida em organismos como *Neospora caninum* (CUI et al., 2012a) e *T. gondii* (CUI et al., 2012b), sendo que neste último foi testada como imunógeno em uma vacina de DNA recombinante obtendo resultados promissores.

Para avaliar a imunogenicidade de IMP1 em *E. tenella*, Yin et al (2013) testaram uma vacina composta por EtIMP1 associada a um adjuvante molecular do flagelo de *Salmonella typhimurium* denominado *FliC* obtido através de expressão em *Escherichia coli*. Esta vacina recombinante foi testada frente a outro grupo contendo EtIMP1 associada a um adjuvante comum (Freund's Complete Adjuvant - FCA). Os efeitos clínicos dos grupos imunizados com EtIMP1-vFliC foram melhores que EtIMP1-FCA, mesmo este último apresentando boa resposta quando comparado a grupos controles. Por apresentar resultados melhores em ganho de peso, eliminação de oocistos e escore de lesão cecal, os autores deste trabalho sugerem esta proteína

como um promissor imunógeno frente a desafio contra *E. tenella*, afirmando ser este o primeiro relato científico de tal feito com EtIMP1.

De acordo com Yin et al (2014), em outro estudo, estes autores, após análise de clonagem e sequenciamento, sugeriram que IMP 1 trata-se de uma proteína de membrana de parasitos pertencentes ao Filo Apicomplexa. Neste mesmo experimento, a fim de avaliar a imunogenicidade de EtIMP1, um derivado de sua porção C-terminal foi expresso em vetor bacteriano e testado como imunógeno em frangos. A imunização frente a desafio homólogo contra *E. tenella* proporcionou melhora no ganho de peso, diminuição na eliminação de oocistos e redução no escore de lesão cecal quando comparado com grupo controle. Desta forma os autores propõem a EtIMP1 como candidata a vacina de subunidade contra *E. tenella*.

5 Conclusão

Diversos antígenos recombinantes vem sendo testado ao longo dos anos como uma alternativa segura e eficaz na prevenção e controle da coccidiose em frangos. Todavia, a escolha dos antígenos corretos na confecção de uma vacina recombinante é de extrema importância, sendo que estes devem ser capazes de melhorar parâmetros como o ganho de peso, eliminação de oocistos, escore de lesão, bem como estimular a imunidade humoral e celular dos frangos.

Apesar da diversidade de antígenos identificados e dos resultados promissores publicados em artigos científicos, a sua aplicação em avicultura ainda é discreta.

REFERÊNCIAS

BLAKE, D. P.; BILLINGTON, K. J.; KOPESTAKE, S. L.; OAKES, R. D.; QUAIL, M. A.; WAN, K.; SHIRLEY, M. W.; SMITH, A. L. Genetic mapping identifies novel highly protective antigens for an apicomplexan parasite. *Plos Pathogens*. Vol. 7 (2), 2011.

BOGADO, A. L. G. *Patogenicidade e imunogenicidade de uma vacina atenuada e uma vacina contendo proteínas de esporozoítos de Eimeria tenella em frangos de corte*. 2009, 75f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

BOGADO, A. L. G. *Avaliação da imunidade protetora em frangos de corte vacinados com proteína recombinante rHSP70 de Eimeria tenella*. 2013, 64f. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

CACHO, E.; GALLEGRO, M.; PAGES, M.; MONTEAGUDO, L.; SÁNCHEZ-ACEDO, C. HSP70 is a part of the synaptonemal complex in *Eimeria tenella*. *Parasitology International* 57 - Elsevier, p. 454-459, 2008.

CHAPMAN, H.D.; JEFFERS, T. K. Vaccination of chickens against coccidiosis ameliorates drug resistance in commercial poultry production. *International Journal of Parasitology: Drugs and drug resistance*, v.4, p.214-217, 2014.

CUI, X.; LEI, T.; YANG, D. Y.; HAO, P.; LIU, Q. Identification and characterization of a novel *Neospora caninum* immune mapped protein 1. Cambridge Journals: *Parasitology*, v. 139, n. 08, p. 998-1004, 2012.

DALLOU, R. A.; LILLEHOJ, H. S.; KLINMAN, D. M.; DING, X.; MIN, W.; HECKERT, R. A.; LILLEHOJ, E. P. In ovo administration of CpG oligonucleotides and the recombinant microneme protein MIC2 protects against *Eimeria* infection. *Vaccine*. Vol. 23, p. 3108-3113, 2005.

DALLOUL, R.A., LILLEHOJ, H.S. Poultry coccidiosis: recent advancements in control measures and vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 5, 143–163, 2006.

DANFORTH HD, AUGUSTINE PC, RUFF MD, MCCANDLISS R, STRAUSBERG RL, LIKEL M. Genetically engineered antigen confers partial protection against avian coccidial parasites. *Poultry Science*, v.68, p.1643-52, 1989.

DINIZ, G. S.; BORSOI, A.; LOPES, J. M.; GARCIA, J. L.; GUIMARÃES JÚNIOR, J. S. Salinomocina e semduramicina associadas em diferentes concentrações no controle da eimeriose em frangos de corte. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 18, n. 4, p. 53-58, 2009.

DUNN, P. P. J.; BILLINGTON, K.; BUMSTEAD, J. M.; TOMLEY, F. M. Isolation and sequences of cDNA clones for cytosolic and organellar hsp70 species in *Eimeria spp.* *Molecular and Biochemical Parasitology*, 70, p. 211-215, 1995.

DU, A.; HU, S.; WANG, S. *Eimeria tenella*: Ginsenosides-enhanced immune response to the immunization with recombinant 5401 antigen in chickens. *Experimental Parasitology*. Vol. 111, p. 191-197, 2005.

FERNANDEZ-ROBLEDO, J. A.; VASTA, G. R. Production of recombinant proteins from protozoan parasites. *Trends in Parasitology*. Vol. 26, n. 5, p. 244-254, 2010.

GARCIA, J. L.; GUIMARÃES JUNIOR, J. S.; BOGADO, A. L. G.; BUNGNI, F. M.; RAMALHO, D. C.; SOUZA, L. M. *Eimeria tenella*: utilization of a nasal vaccine with sporozoite antigens incorporated into iscom as protection for broilers breeders against a homologous challenge. *Experimental Parasitology*. 120, 185-190, 2008.

HOAN, T. D.; THAO, D. T.; GADAHY, J. A.; SONG, X.; XU, L.; YAN, R.; LI, X. Analysis of humoral immune response and cytokines in chickens vaccinated with *Eimeria brunetti* apical membrane antigen-1 (EbAMA1) DNA vaccine. *Experimental Parasitology*, 144, p. 66-72, 2014.

INNES, E. A.; VERMEULEN, A. N. Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites *Eimeria*, *Toxoplasma* and *Neospora*. *Cambridge Journals: Parasitology*, 133, p. 353-362, 2006.

JENKINS, M. C.; LILLEHOJ, H. S.; BARTA, J. R.; DANFORTH, H. D.; STROHLEIN, D. A. *Eimeria acervulina*: Cloning of a cDNA encoding an immunogenic region of

several related merozoite surface and rhoptry proteins. *Experimental Parasitology*, 70, p. 66-72, 1990.

KLOTZ, C.; MARHÖFER, R. J.; SELZER, P. M.; LUCIUS, R.; POGONKA, T. *Eimeria tenella*: Identification of secretory and surface proteins from expressed sequence tags. *Experimental Parasitology* 111, p. 14-23, 2005.

KLOTZ, C. Identification of *Eimeria tenella* genes encoding for secretory proteins and evaluation of candidates by DNA immunization studies in chickens. *Vaccine* 25, p. 6625-6634, 2007.

KNOX, P. D.; REDMOND, D. L. Parasite vaccines - recent progress and problems associated with their development. *Cambridge Journals: Parasitology*, 133, p. 1-8, 2006.

LAURENT, F.; BOURDIEU, C.; YVORÉ, P.; PÉRY, P. Cloning and expression of cDNA encoding an *Eimeria acervulina* 70kDa sporozoite protein which is related to the 70kDa heat-shock protein family. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 66, p. 349-352, 1994.

LILLEHOJ, E. P.; YUN, C. H.; LILLEHOJ, H. S. Vaccines against the avian enteropathogens *Eimeria*, *Cryptosporidium* and *Salmonella*. *Animal Health Research Reviews* 1. 47-65, 2000.

MA, D.; GAO, M.; LI, J.; MA, C.; LI, G. Construction of novel cytokine by fusion of chicken IL-2 signal peptide to mature chicken IL-15 and comparison of the adjuvant effects by DNA immunization against *Eimeria* challenge. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v. 156, p. 114-120, 2013.

MARTINS, G. F. *Clonagem seqüenciamento e expressão de proteínas recombinantes de Eimeria tenella*. 2011, 51f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

MARTINS, G. F.; BOGADO, A. L. G.; GUIMARÃES JÚNIOR, J. S.; GARCIA, J. L. O uso de vacinas no controle da coccidiose aviária. *SEMINA: Ciências Agrárias*, v. 28, n. 1, p. 97-104, 2012.

MATSUBAYASHI, M.; HATTA, T.; MIYOSHI, T.; MAN, A.; SASAI, K.; SHIMURA, K.; ISOBE, T.; KITA, K.; TSUJI, N. High-throughput RNA sequencing profiles and transcriptional evidence of aerobic respiratory enzymes in sporulating oocysts and sporozoites of *Eimeria tenella*. *Infection, Genetics and Evolution*, 18, 269-276, 2013.

MIN, W.; KIM, W. H.; LILLEHOJ, E. P.; LILLEHOJ, H. S. Recent progress in host immunity to avian coccidiosis: IL-17 family cytokines as sentinels of the intestinal mucosa. *Developmental and Comparative Immunology*, 41, 418-428, 2013.

MOHAMED, R. M.; AOSAI, F.; CHEN, M.; MUN, H. S.; NOROZE, K.; BELAL, U. S.; PIAO, L. X.; YANO, A. Induction of protective immunity by DNA vaccination with *Toxoplasma gondii* HSP70, HSP30 and SAG1 genes. *Vaccine*, 21, 2852-2861, 2003.

MOREIRA, J. L. S. *Construção de cassetes de expressão de proteínas heterólogas em lactobacilos para uso em vacinas orais contra a coccidiose aviária*. 2008, 84f. Dissertação (Mestrado em Genética), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

OAKES, R. D.; KURIAN, D.; BROMLEY, E.; WARD, C.; LAL, K.; BLAKE, D. P.; REID, A. J.; PAIN, A.; SINDEN, R. E.; WASTLING, J. M.; TOMLEY, F. M. The rhoptry proteome of *Eimeria tenella* sporozoites. *International Journal for Parasitology*, 43, 181-188, 2013.

PEROVAL, M.; PERY, P.; LABBE, M. The heat shock protein 90 of *Eimeria tenella* is essential for invasion of host cell and schizont growth. *International Journal for Parasitology*, n.36, n.10-11, p.1205-1215, 2006.

PINHEIRO, B. C.; DA SILVA, A. B. S.; CAVALCANTE, M. M. A. S.; MENDONÇA, I. L.; CONDE JÚNIOR, A. M. Coccidiose em frangos de produção. *Revista Científica de Medicina Veterinária*, 22, 2014.

PROELLOCKS, N. I.; COPPEL, R. L.; WALLER, K. L. Dissecting the apicomplexan rhoptry neck proteins. *Trends in Parasitology*, v. 26, n. 6, p. 297-304, 2010.

QI, N. S.; WANG, Y. Y.; LIAO, S. Q.; WU, C. Y.; LV, M. N.; LI, J.; TONG, Z. X.; SUN, M. F. Partial protective of chickens against *Eimeria tenella* challenge with recombinant EtMIC-1 antigen. *Parasitol Res*, 112, 2281-2287, 2013.

SANTIN, E.; MORAES, M. L. Imunidade e nutrição em aves. In: *VI Congresso Latino Americano de Nutrição Animal - SALA AVES*, 6, 23-26 set, 2014. Estância de São Pedro, São Paulo.

SATHISH, K.; SRIRAMAN, R.; SUBRAMANIAN, B. M.; RAO, N. H.; BALAJI, K.; NARASU, M. L.; SRINIVASAN, V. A. Plant expressed EtMIC2 is an effective immunogen in conferring protection against chicken coccidiosis. *Vaccine*, 29, 9201-9208, 2011.

SATHISH, K.; SRIRAMAN, R.; SUBRAMANIAN, B. M.; RAO, N. H.; KASA., B.; DONIKENI, J.; NARASU, M. L.; SRINIVASAN, V. A. Plant expressed coccidial antigens as potential vaccine candidates in protecting chicken against coccidiosis. *Vaccine*, 30, 4460-4464, 2012.

SHEN, X.; WANG, C.; ZHU, Q.; LI, T.; YU, L.; ZHENG, W.; FEI, C.; QIU, M.; XUE, F. Effect of Diclazuril on Hsp90 in the second-generation merozoites of *Eimeria tenella*. *Veterinary Parasitology*, 185, 290-295, 2012.

SHI, W.; LIU, Q.; ZHANG, J.; SUN, J.; JIANG, X.; GENG, J.; WANG, F.; XIAO, Y.; LI, H.; ZHAO, X. Co-expression of EtMIC2 protein and chicken interleukin-18 for DNA vaccine against chicken coccidiosis. *Research in Veterinary Science*, 97, 64-70, 2014.

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

SUBRAMANIAN, B. M.; SRIRAMAN, R.; HANUMANTHA RAO, N.; RAGHUL, J.; THIAGARAJAN, D.; SRINIVASAN. Cloning, expression and evaluation of the efficacy of a recombinant *Eimeria tenella* sporozoite antigen in birds. *Vaccine*, 26, p. 3483-3496, 2008.

WILLIAMS, R.B. A compartmentalized model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. *International Journal for Parasitology*, v.29, n.8, p.1209-1229, 1999.

WITCOMBE, D. M.; FERGUSON, D. J. P.; BELLI, S. I.; WALLACH, M. G.; SMITH, N. C. *Eimeria maxima* TRAP family protein EmTFP250: subcellular localisation and

induction of immune responses by immunisation with a recombinant C-terminal derivative. *International Journal for Parasitology*, 34, 861-872, 2004.

YIN, G.; QIN, M.; LIU, X.; SUO, J.; TANG, X.; TAO, G.; HAN, Q.; SUO, X.; WU, W. An *Eimeria* vaccine candidate based on *Eimeria tenella* immune mapped protein 1 and the TLR-5 agonist *Salmonella typhimurium* FliC flagellin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 440, 437-442, 2013.

YIN, G.; LIN, Q.; WEI, W.; QIN, M.; LIU, X.; SUO, X.; HUANG, Z. Protective immunity against *Eimeria tenella* infection in chickens induced by immunization with a recombinant C-terminal derivative of EtIMP1. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 162, 117-121, 2014.

YOU, M. J. Detection of four important *Eimeria* species by multiplex PCR in a single assay. *Parasitology International*, 63, 527-532, 2014.

YUN, C. H.; LILLEHOJ, H. S.; LILLEHOJ, E. P. Intestinal immune responses to coccidiosis. *Developmental and Comparative Immunology*, 24, 303-324, 2000.

ZHANG, L.; MA, L.; LIU, R.; ZHANG, Y.; ZHANG, S.; HU, C.; SONG, M.; CAI, J.; WANG, M. *Eimeria tenella* heat shock protein 70 enhances protection of recombinant microneme protein MIC2 subunit antigen vaccination against *E. tenella* challenge. *Veterinary Parasitology*, 188, 239-246, 2012.

ZHANG, J.; CHEN, P.; SUN, H.; LIU, Q.; WANG, L.; WANG, T.; SHI, W.; LI, H.; XIAO, Y.; WANG, P.; WANG, F.; ZHAO, X. *Pichia pastoris* expressed EtMIC2 protein as a potential vaccine against chicken coccidiosis. *Veterinary Parasitology*, 205, 62-69, 2014a.

ZHANG, Z. C.; HUANG, J. W.; LI, M. H.; SUI, Y. X.; WANG, S.; LIU, L. R.; XU, L. X.; YAN, R. F.; SONG, X. K.; LI, X. R. Identification and molecular characterization of microneme 5 of *Eimeria acervulina*. *PLoS One*, 9 (12): e115411. doi:10.1371/journal.pone.01155411, 2014b.

ZULPO, J. S. ; PERETTI, J.; ONO, L. M.; LONGHI, E.; OLIVEIRA, M. R.; GUIMARÃES, I. G.; HEADLEY, S. A.; GUIMARÃES JÚNIOR, J. S.; GARCIA, J. L. Patogenicidade e observações histopatológicas de frangos de corte infectados experimentalmente com

isolados de *Eimeria tenella*, *E. acervulina* e *E. máxima*. *SEMINA: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 28, n. 1, p. 97-104, 2007.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral:

- Avaliar a imunogenicidade da proteína rHSP70 de *E. tenella* associada a toxina colérica por via ocular em frangos de corte.

Objetivos Específicos:

- Expressar e purificar a proteína rHSP70 de *E. tenella*
- Avaliar parâmetros como ganho de peso, conversão alimentar, eliminação de oocistos, taxa de fecundidade do parasito e escore de lesão cecal nos diferentes tratamentos
- Avaliar a técnica de ELISA para detectar anticorpos contra rHSP70 de *E. tenella*

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

**Avaliação da imunogenicidade da proteína rHSP70 de
Eimeria tenella em frangos de corte por via ocular.**

Resumo

Nos últimos anos vem se intensificando a busca por um imunógeno capaz de conferir proteção contra coccidiose em frangos. A coccidiose representa um problema sanitário e econômico importante para a indústria avícola, tendo a espécie *Eimeria tenella* como representante mais patogênico dentre as sete reconhecidas. Com o aparecimento de resistência as drogas comumente e indiscriminadamente utilizadas para o seu controle, houve uma mudança de enfoque no controle desta doença que não se limita mais ao desenvolvimento de novas drogas. Desta forma o presente projeto teve como objetivo avaliar a imunogenicidade da proteína rHSP70 de *Eimeria tenella* em frangos de corte pela via ocular. O segmento de DNA correspondente foi incorporado ao vetor de expressão de proteínas pTrcHis2 TOPO o qual foi inserido pela reação de transformação em *E. coli* TOP10 para obtenção e purificação das proteínas recombinantes. Foram utilizadas no experimento 80 aves distribuídas em quatro tratamentos: G1 - rHSP70 mais toxina colérica (n=20); G2 – soro albumina bovina e toxina colérica (n=20), G3 – somente PBS (controle positivo, n=20) e G4 - somente PBS (controle negativo, n=20). Os tratamentos foram executados por via ocular aos dias 7 e 14 do experimento. No dia 21, todos os tratamentos, a exceção de G4, foram desafiados com 5×10^4 oocistos esporulados de *E. tenella*. Foram avaliados o ganho de peso, conversão alimentar, eliminação de oocistos, fecundidade e anticorpos anti-rHSP70. A clonagem e expressão do gene hsp70 permitiu a produção de uma proteína rHSP70 de aproximadamente 23kDa. Quanto ao ganho de peso G1 apresentou um aumento de 2,7% em relação a G4, enquanto G3 apresentou redução de 2,22% neste parâmetro. A titulação de anticorpos demonstrou uma intensa resposta em G1 no pós-desafio. Apesar da maior eliminação de oocistos em G1, este apresentou diferenças estatísticas significantes somente quando comparado com o controle negativo ($p=0,0162$). Da mesma forma não foi observado diferença estatística entre os grupos desafiados no quesito escore de lesão ($p=0,0137$). Os tratamentos não promoveram a melhora nos parâmetros estudados, no entanto foi observado altos títulos de anticorpos pós desafio, sugerindo tal proteína como promotora da imunidade humoral.

Palavras chaves: *Eimeria tenella*, HSP70, proteínas recombinantes, coccidiose, vacinas.

Abstract

In recent years has intensified the search for an immunogen capable of conferring protection against coccidiosis in chickens. Coccidiosis is a health and economic issue important to the poultry industry, and the species *Eimeria tenella* as more pathogenic representative among the seven recognized. With the emergence of resistance to drugs commonly used indiscriminately and for their control, there was a shift in focus in the control of this disease is no longer limited to the development of new drugs. Thus this project aimed to evaluate the immunogenicity of the protein rHSP70 *Eimeria tenella* in broilers by the ocular route. The corresponding DNA segment is incorporated into the protein expression vector pTrcHis2 TOPO which was inserted by the reaction of transformation into TOP10 *E. coli* and purification to obtain the recombinant protein. They were used in the experiment 80 birds distributed in four treatments: G1 - rHSP70 more cholera toxin (n = 20); G2 - bovine serum albumin and cholera toxin (n = 20), G3 - PBS only (positive control, n = 20) and G4 - PBS only (negative control, n = 20). The treatments were performed by ocular route at days 7 and 14 of the experiment. On day 21, all treatments, except for G4, were challenged with 5×10^4 sporulated oocysts of *E. tenella*. The parameters evaluated were weight gain, feed conversion, oocysts shedding, fertility and anti-rHSP70 antibodies. The cloning and expression of the hsp70 gene allowed the production of a protein of approximately 23kDa rHSP70. As for the weight gain G1 increased by 2.7% compared to G4, while G3 declined by 2.22% in this parameter. Titration showed intense antibody response in G1 post-challenge. Although most oocysts shedding in G1, it showed only statistically significant differences when compared to the negative control ($p = 0.0162$). Similarly was no statistical difference between the groups challenged in the category injury score ($p = 0.0137$). The treatments did not promote improvement in the studied parameters, however it was observed high titers of antibodies after challenge, suggesting this protein as a promoter of humoral immunity.

Key words: *Eimeria tenella*, HSP70, recombinant proteins, coccidiosis, vaccines.

1 INTRODUÇÃO

A coccidiose aviária é uma doença parasitária, causada por protozoários do gênero *Eimeria* pertencentes ao Filo Apicomplexa, responsáveis por perdas econômicas estimadas em US\$ 3 bilhões/ano na avicultura de produção (DALLOU; LILLEHOJ, 2006). Atualmente existem sete espécies capazes de infectar frangos: *E. tenella*, *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. necatrix*, *E. mitis* e *E. praecox* (MARTINS, et al., 2012). Destas espécies, *E. tenella* é considerada uma das espécies mais patogênicas causando grande mortalidade e perdas econômicas (MATSUBAYASHI et al., 2013).

A resistência a drogas é um problema sério e recorrente em criações intensivas, não sendo diferente na coccidiose aviária tanto em avicultura industrial quanto colonial. Esta resistência, em vários níveis, tem sido documentada às doze drogas aprovadas e utilizadas atualmente em avicultura (CHAPMAN; JEFFERS, 2014). Martins et al (2012) implicam este fato ao uso indiscriminado destas drogas em criações comerciais, reduzindo, conseqüentemente, sua eficácia em usos posteriores.

As estratégias atuais de controle da coccidiose em frangos limitam-se, além do uso de drogas anticoccidianas, às vacinas vivas, entretanto estas também apresentam problemas como algum grau de patogenicidade, alto custo de produção e a possível reversão da atenuação (ZHANG et al., 2014a). Devido a este fato, buscase, na atualidade, uma alternativa viável para o controle desta enfermidade. Dentre as alternativas pesquisadas, ressalta-se a busca por um antígeno recombinante ou vacinas de DNA recombinante. Diversos estudos mostram que o uso destes imunógenos podem estimular tanto a imunidade humoral quanto a celular, produzindo uma resposta imune efetivamente protetora (ZHANG et al., 2014b).

As "*heat shock proteins*" (HSP) pertencem a uma grande família de proteínas, preservadas durante a evolução e encontradas no citoplasma e mitocôndrias das células de diversos organismos, de bactérias a seres humanos (DUNN et al., 1995; CACHO et al., 2008). Possuem diversas funções dentro das células, sendo responsáveis por manter a homeostasia frente a situações de stress celular, principalmente em variações térmicas críticas. De forma mais específica, ligam-se, transportam e inibem a desnaturação de proteínas produzidas dentro das

células, fato este que lhe renderam o nome de "*chaperonas*" ou proteínas carreadoras (DUNN et al., 1995; ZHANG, et al., 2012).

A HSP70 é uma proteína de aproximadamente 70kDa, presente em esporozoítos de *Eimeria*, tendo papel importante no processo de formação dos esporocistos e esporozoítos durante a esporulação, por atuar junto ao complexo sinaptonemal durante o processo de meiose (LAURENT et al., 1994; CACHO et al., 2008). Ainda acredita-se que possua papel importante no processo de invasão da célula hospedeira, atuando junto a HSP90, permitindo a estabilização de proteínas críticas transmembranas durante a adesão celular (PEROVAL et al., 2006). Desta forma alguns pesquisadores testaram o potencial imunogênico desta proteína e sugeriram como potencial antígeno recombinante a ser incorporado no desenvolvimento de vacinas recombinantes (MOHAMED et al., 2003; ZHANG et al., 2012).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a imunogenicidade da proteína rHSP70 obtida de esporozoítos de *E. tenella* em frangos de corte por via ocular.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local

O trabalho foi realizado nos Laboratórios de Parasitologia e Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, localizado no Campus da Universidade Estadual de Londrina (UEL), município de Londrina, norte do Paraná, Brasil. O presente projeto foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais da UEL sob número 19865.2014.01

2.2 Produção de oocistos para obtenção de esporozoítos e desafio homólogo

Foi utilizada, no presente estudo, a cepa virulenta de *E. tenella*, obtida a campo e mantida no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da Universidade Estadual de Londrina. A metodologia foi baseada em adaptações da técnica descrita por Long (1971). A cepa foi multiplicada em 80 pintinhos, livres de coccídios, e os oocistos foram recuperados do ceco, após a eutanásia por CO₂.

Decorrida a esporulação, os oocistos foram preservados em solução de bicromato de potássio 2,5%.

2.3 Preparo da suspensão de esporozoítos

A purificação dos esporozoítos de *E. tenella* foi realizada conforme descrito por Dulski e Turner (1988). Para isto, oocistos de *E. tenella*, foram esterilizados em hipoclorito de sódio conforme descrito por Schmatz et al. (1984). Após a esporulação os oocistos foram lavados em 10 mM de PBS (Phosphate Buffered Saline) com pH 7,5 e suspensos em tubos de 50 ml de PBS frio contendo esferas de vidro de 3mm, para a ruptura da parede do oocisto por meio do vórtex (5 minutos). A sedimentação dos esporocistos foi por centrifugação a 1.600 x g por 10 minutos, em seguida foi feita a ressuspensão do sedimento em solução de sacarose 1 M, seguido por uma nova centrifugação. Os esporocistos sedimentados foram ressuspensos em tubos de 50ml contendo Tripsina 0,25% e ácido taurodeoxicolato 4% (Sigma) em PBS e permaneceram sob agitação em banho-maria a 42°C por 45 minutos. Os esporozoítos excistados foram centrifugados, para sedimentação, a 700 x g por 20 minutos e o sobrenadante cuidadosamente decantado. Em seguida, foram realizadas três lavagens em PBS e sua concentração foi ajustada para 10⁷ esporozoítos/ml.

2.4 Produção das Proteínas Recombinantes

2.4.1 Construção dos plasmídeos de expressão

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 GeneBank (Z46965.1) foi selecionado um fragmento baseado na predição da hidrofobicidade de uma região do polipeptídeo, sendo utilizado os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para o gene hsp70 FW (5'-GAGAAAGAAGACGGACGCAC-3') e RW (5'-CTGATACACCTTGATGCCAC-3'), confeccionados a partir do software "Premier Primer 5". A sequência de cDNA que codifica o antígeno HSP70 de *E. tenella* foi obtida por transcriptase reversa a partir de 1µg de RNA total através do kit Protoscript[®] M-

MuLV (NEB). O quadro aberto de leitura (open read fram- ORF) do gene Hsp70 foi amplificado pela PCR utilizando os primers descritos acima. Para a realização da PCR foram utilizados 2,5 µl de tampão 10 vezes concentrado, 2 µl dNTPs (0,2 mM), 20 pmol de cada conjunto de primers, 0,25 µl da enzima taq polimerase *Platinum*[®] (*Invitrogen, life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) e 50 ng de DNA de *E. tenella*, em um volume total de 25 µl. A PCR foi submetida a um ciclo de 94°C/ 5 minutos e ciclos específicos de anelamento para cada primer. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corados com SYBR[®] GREEN (*Invitrogen, life technologies - USA*).

2.4.2 Clonagem do gene *hsp70*, expressão em *Escherichia coli* e purificação

Os produtos da amplificação analisados em gel de agarose a 1,5% tiveram as bandas de interesse recortadas para purificação utilizando 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 plasmídios foram inseridos pela reação de transformação em *E. coli One Shot TOP10*[®] (*Invitrogen, life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) conforme instrução do fabricante. O sequenciamento foi realizado a partir de uma colonial que expressou a proteína da qual foi feita a PCR com os primers específicos para *pTrcHis2 TOPO*[®], após a purificação em gel de agarose 1,5%. O DNA foi submetido ao sequenciamento dideoxy usando novamente os primers específicos para *pTrcHis2 TOPO*[®] e confirmado a manutenção de ORF, conforme Igarashi et al (2010) antes de realizada em maior escala..

A expressão da proteína foi realizada na cepa *E. 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 alcançar a densidade óptica (DO₆₀₀) de 0,5-0,7, aferido em espectrofotômetro *iMark Microplate Reader*[®] (*BioRad, Hercules, CA, USA*). A indução da expressão da proteína rHSP70 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, seguida pelas lavagens e eluições com ureia a 8M. A solução final foi dialisada em PBS e

submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%. A concentração das proteínas foi determinada com a utilização kit *Pierce BCA Protein Assay Kit*[®] (*Thermo Scientific*[®]).

2.5 Produção de anticorpos policlonais

Para a obtenção de anticorpos policlonais foram utilizadas 12 aves. Os animais foram divididos em três grupos com quatro animais cada sendo cada grupo imunizado pela via subcutânea com 100 µg de proteínas recombinantes rHSP70. Os animais receberam 2 doses de imunizações em um intervalo de 7 dias (ao 7° e 14° dias de experimento). No 21° dia de experimento (dia do desafio) foi realizada a colheita de sangue sem anticoagulante para a obtenção do soro policlonal monoespecífico. O soro foi armazenado a -20 °C até a realização da prova de ELISA.

2.6 Delineamento Experimental e Manejo

Foram utilizadas 80 aves, não sexadas, com um dia de idade, não vacinadas contra coccidiose, distribuídas em quatro tratamentos, sendo cada tratamento composto por 20 aves. As aves receberam ração e água *ad libitum*. A ração foi oferecida igualmente para todos os grupos, obedecendo aos padrões de manejo da indústria. Foi utilizada ração convencional para as fases inicial, recria e terminação sem a adição de anticoccidiano. Os grupos foram alocados em baterias metálicas e divididos em quatro tratamentos com quatro repetições cada (5 animais por gaiola/repetição): G1 - 100µg rHSP70 mais 0,5µg de toxina colérica (n=20); G2 – 100 µg soro albumina bovina e 0,5µg de toxina colérica (n=20), G3 – somente PBS (controle positivo, n=20) e G4 - somente PBS (controle negativo, n=20) . Os tratamentos de G1, G2, G3 e G4 foram administrados por instilação via ocular aos dias 7 e 14 do experimento. No dia 21, os animais dos tratamentos G1, G2 e G3 (controle positivo) foram desafiados pela via oral com 5×10^4 oocistos esporulados de *E. tenella*, a exceção do G4 (controle negativo).

2.7 Colheita de amostras

O peso corporal foi determinado semanalmente, para determinação do ganho de peso médio, bem como a sobra de ração para o cálculo do índice de conversão alimentar (ICA). Além destes parâmetros foi realizado o cálculo da porcentagem de aumento do ganho de peso, conforme descrito previamente por Ma, et al (2011) conforme segue: $GP(\%) = (GPb/GPa) \times 100$, onde GPa é a média do ganho de peso do grupo controle negativo (não vacinado, não desafiado) e GPb é a média do ganho de peso no grupo avaliado. Amostras de soro para avaliação da imunidade humoral foram obtidas nos dias 21 (desafio) e 28 (uma semana pós desafio). Sete dias após o desafio 2 animais de cada repetição foram eutanasiados (8 animais por tratamento) e utilizados para avaliação do escore de lesão. Oocistos foram investigados da cama diariamente a partir do 5º dia pós desafio. A porcentagem de proteção contra a eliminação de oocistos (ROSE e MOCKETT, 1983) foi calculada como segue: $[(\text{número de oocistos do G3} - \text{número de oocistos do animais imunizados (G1 ou G2)}) / \text{número de oocistos do G3}] \times 100\%$.

2.8 Teste Imunoenzimático (ELISA)

O teste de ELISA foi realizado como descrito por Garcia et al. (2006). As diluições foram padronizadas comparando-se as diluições de soro, antígenos, e conjugado. A proteína recombinante rHSP70, foi usada como antígeno para adsorção das placas de microtitulação de poliestireno com 96 poços de fundo chato (*Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp, Denmark*). Foi utilizado, para cobrir as placas, 0.1ml de antígenos (5µg/ml) diluído em 0.1M carbonato tamponado (pH 9.6) e incubado overnight a 6°C. Em seguida elas foram lavadas três vezes com PBS-tween 20 (50mM tris, pH 7.4, que contém 150mM cloreto de sódio e 0,05% tween 20) e locais de imunidade não específicas foram bloqueadas através de incubação por 1h30min a 37°C com carbonato tamponado que contém 8% leite em pó desnatado. Controles e soros testados foram diluídos 1:500 em PBS-tween 20 contendo 5% de leite em pó desnatado e então adicionados às placas de microtitulação em duplicatas, 0.1 ml em cada poço, e incubado por 1 hora a 37°C. Depois de lavar, foi adicionado o conjugado HRP anti-IgY (*Laboratório de Bethyl, Montgomery, TX, E.U.A.*) diluído 1:1.000 em PBS-tween 20 - 5% leite em pó desnatado, 0.1 ml foi acrescentado em cada poço e incubado por 1h30min a 37°C. 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 1N HCl. A densidade óptica (OD) foi lida a 490nm em um leitor de microplaca de ELISA. Os valores médios de absorbância foram calculados e o valor de OD foi calculado como descrito por Garcia et al (2006). Para soros controles positivo e negativo foi incluído em todas as placas e um valor de OD corrigido (ODcorr) foi calculado como segue:

$$\text{ODcorr} = \frac{(\text{ODamostra} - \text{ODplaca controle negativo})}{(\text{ODplaca controle positivo} - \text{ODplaca controle negativo})}$$

Foi considerado soro positivo quando $\text{ODcorr} > [\text{OD médio (do soro do controle de negativo)} + 2\text{SD (desvio padrão do soro controle negativo)}]$.

2.9 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, para estabelecer diferenças entre as características estudadas. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Nos parâmetros de eliminação de oocistos e escore de lesão foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e comparação múltipla com o teste de Dunn. O teste t de Student foi utilizado para averiguar diferenças estatísticas entre as respostas imunes.

3 RESULTADOS

3.1 Produção de rHSP70

A eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com SYBR® GREEN, dos produtos da PCR dos plasmídeos clonados pTrc/Hsp70, permitiu a observação de um fragmento de aproximadamente 768pb (Figura 1), o qual apresentou 100% de identidade gênica quando comparado com a seqüência depositada no GeneBank. O processo de expressão, seguido de purificação, proporcionou uma proteína de aproximadamente 23kDa quando submetida a corrida em gel de poliacrilamida a 12% (Figura 2).

3.2 Avaliações do ganho de peso e índice de conversão alimentar (ICA)

O ganho de peso dos diferentes grupos em gramas foi de G1=416±6,6; G2=405±183; G3=396±33,6 e G4=405±7,75. Neste parâmetro não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos (p=0,55), fato este detalhado na Tabela 1. Os resultados mostraram que G1 (rHSP70 associada a toxina colérica) apresentou uma porcentagem de aumento no ganho de peso de 2,7% em relação a G4 (controle negativo). Em contrapartida, G3 (controle positivo) apresentou uma redução de 2,22% no ganho de peso quando comparado a G4 (controle negativo). O grupo tratamento G2 (somente toxina colérica) não apresentou diferença na porcentagem de ganho de peso, quando comparado a G4 (controle negativo). O ICA apresentou resultados semelhantes quando comparado entre os demais grupos, como visto também na Tabela 1.

3.3 Titulação de anticorpos anti-rHSP70

As DO's médias obtidas dos níveis de anticorpos anti-rHSP70, através do teste de ELISA, foram no pré-desafio (dia 21 do experimento): G1=0,60±0,34; G2=0,59±0,19; G3=0,86±0,43 e G4=0,61±0,17. Já no dia 28 do experimento, uma semana pós desafio, as DO's foram: G1=0,97±0,57; G2=0,61±0,18; G3=0,55±0,12 e G4=0,55±0,21. Estes dados podem ser vistos na Figura 3.

3.4 Avaliação da eliminação de oocistos e escore de lesão

Os resultados obtidos para a eliminação de oocistos foram G1=25,07x10⁸; G2=11,72x10⁸; G3=8,20x10⁸. Como o G4, controle negativo (não foi desafiado e não vacinado), o valor de eliminação foi G4=0. Apesar da variação nos valores de eliminação de oocistos, não foi verificado diferença estatística significativa entre os grupos desafiados, porém houve diferença significativa entre G1 e G4 (p=0,0162). Além da eliminação de oocistos também foi calculada a taxa de fecundidade dos diferentes grupos desafiados como segue: G1=67,29%; G2=30,03%; G3=0. Estes valores podem ser observados na Tabela 2. A taxa de proteção contra eliminação de oocistos foi de 30,8% em G2, porém negativo em G1 quando comparado com G3 (-141,79%).

As médias dos escores de lesão foram: G1=0,62; G2=0,62, G3=0,75 e G4=0 ($p=0,0137$), com os grupos controle positivo (G3) e controle negativo (G4) apresentando diferença estatística entre si, enquanto os grupos G1 e G2 não apresentaram diferenças.

4 DISCUSSÃO

Ao longo da última década pode-se testemunhar o desenvolvimento de tecnologias moleculares, bem como o aumento do número de parasitos que tiveram o seu DNA sequenciado. Estas descobertas revolucionaram a ciência e mostraram-se uma alternativa eficaz aos métodos convencionais de tratamento e controle de doenças (FERNANDEZ-ROBLEDO; VASTA, 2010). O uso de drogas no controle da coccidiose mostrou-se eficaz ao longo das últimas décadas, porém seu uso acarretou no surgimento de cepas resistentes, alto custo em tratamentos profiláticos, além do aumento da exigência do mercado consumidor que refuta o uso destes medicamentos, principalmente pela possibilidade de resíduos no produto final (INNES; VERMEULEN, 2006).

O uso de vacinas vivas, atenuadas ou virulentas em baixa dose, mostrou-se eficaz no controle da coccidiose (BOGADO, et al., 2012), porém seu alto custo, associado a possibilidade de reversão de atenuação ou dificuldade da administração em grandes lotes (vacina viva virulenta em baixa dose) revelou-se um grande problema, diminuindo sua aceitação por parte da indústria avícola (INNES; VERMEULEN, 2006; KNOX; REDMOND, 2006; GARCIA, et al., 2008; MARTINS et al., 2012). Por conta destes inconvenientes o uso de antígenos recombinantes vem crescendo em testes vacinais afim de se encontrar um imunógeno eficiente para o controle desta enfermidade (MARTINS et al., 2012).

Devido suas importantes funções em eventos celulares já descritas no gênero *Eimeria*, diversos autores sugeriram como promissor o uso da proteína HSP70 como imunógeno na confecção de uma vacina recombinante contra a Eimeriose Aviária (LAURENT, et al., 1994; DUNN, et al., 1995; PEROVAL, et al., 2006; CACHO, et al., 2008; ZHANG., 2012). Mohamed et al (2003) publicaram um trabalho no qual utilizou-se uma vacina de DNA recombinante contendo os genes Hsp70, Hsp30 e Sag1, obtendo resultados promissores. Porém tal teste foi realizado em camundongos

em desafio homólogo contra *Toxoplasma gondii*. No que diz respeito a coccidiose aviária, apenas um trabalho, até o presente momento, utilizou HSP70 como imunógeno em vacina recombinante em desafio homólogo contra *Eimeria* (ZHANG, et al., 2012), porém foi evidenciado o potencial de proteção, principalmente quando associada a outra proteína.

No presente estudo foram avaliados diversos parâmetros os quais são indicativos do desenvolvimento da imunidade protetora. Dentre esses parâmetros pode-se citar os zootécnicos, como ganho de peso e conversão alimentar (ICA). Neste estudo não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre os tratamentos, entretanto pôde-se observar que o grupo vacinado com rHSP70 associada a toxina colérica (G1) apresentou um acréscimo no ganho de peso de 2,7%, quando comparado com o grupo controle negativo (não vacinado e não desafiado - G4). O ICA foi um pouco menor no G1 (1,77) em relação ao G3 (1,79). Estes resultados vão contra os encontrados por Zhang et al (2012), onde foi observado um aumento significativo no ganho de peso dos animais vacinados também com a proteína rHSP70 em desafio homólogo contra *Eimeria tenella*. Porém, é importante citar que neste último trabalho, no grupo vacinal, houve a associação de uma segunda proteína recombinante denominada EtMIC2.

A avaliação da titulação de anticorpos anti-rHSP70 nos grupos pré desafio mostrou-se homogênea, à exceção do controle positivo (não vacinado, desafiado - G3) o qual demonstrou níveis de anticorpos mais altos. Entretanto, 7 dias pós desafio, pôde-se observar um aumento significativo nos títulos de anticorpos anti-rHSP70 no grupo imunizado com rHSP70 associada a toxina colérica (G1) quando comparado aos demais tratamentos. Este resultado vai de acordo com Zhang et al (2012).

Com relação a eliminação de oocistos não foi evidenciado diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos desafiados (G1, G2 e G3), porém o grupo vacinado com rHSP70 associada a toxina colérica (G1) mostrou maior eliminação de oocistos que os demais tratamentos. Uma possível explicação para este resultado seria a observação do efeito "*crowding*" nos tratamentos G2 e G3, fato este que possivelmente não tenha ocorrido em G1. Esta hipótese é suportada pela fecundidade da cepa inoculada que mostrou-se maior em G1 em relação aos demais grupos. Devido a esta eliminação maior de oocistos por G1 não foi possível calcular a

taxa de proteção contra eliminação de oocistos, sendo esta possível somente em G2 a qual apresentou uma taxa de proteção de 30,8%.

O escore de lesão não mostrou diferença estatística significativa quando comparado os diferentes tratamentos desafiados (G1, G2 e G3), porém foi discretamente maior no grupo controle positivo (G3) e apresentou-se idêntico entre os grupos G1 (rHSP70 associado a toxina colérica) e G2 (somente toxina colérica). Uma hipótese viável versa acerca da patogenicidade da cepa utilizada que poderia estar comprometida, apresentando uma possível atenuação, pois apesar de ser esperado um escore maior do G3 (controle positivo) em relação aos demais grupos, ainda assim o escore se manteve em níveis baixos. Este resultado vai contra outros trabalhos onde a diferença entre tratamentos e grupo controle foram significativas e os valores de lesão cecal, inclusive no controle positivo, foram maiores dos observados neste estudo (ZHANG et al., 2012; SHI et al., 2014).

O presente estudo evidenciou o potencial imunogênico da proteína rHSP70 associada a toxina colérica na estimulação da imunidade humoral em frangos de corte pela via ocular, mostrando-se um importante agente imunogênico a ser utilizado na confecção de vacinas recombinantes no desafio homólogo contra *Eimeria tenella*.

5 CONCLUSÃO

A imunização das aves com rHSP70 associada a toxina colérica não promoveu melhora nos parâmetros ganho de peso, conversão alimentar, eliminação de oocistos e escore de lesão.

A imunização de frangos de corte com a proteína rHSP70 de *E. tenella* associada ao adjuvante toxina colérica por via ocular promoveu a estimulação da imunidade humoral sistêmica.

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, supl.2, p.3233-3242, 2012.

CACHO, E. et al., HSP70 is a part of the synaptonemal complex in *Eimeria tenella*. *Parasitology International* 57 - Elsevier, p. 454-459, 2008.

CHAPMAN, H.D.; JEFFERS, T. K. Vaccination of chickens against coccidiosis ameliorates drug resistance in commercial poultry production. *International Journal of Parasitology: Drugs and drug resistance*, v.4, p.214-217, 2014.

DULSKI, P.; TURNER, M. The purification of sporocysts and sporozoites from *Eimeria tenella* oocysts using percoll density gradients. *Avian Diseases*, v.32, n.2, p.235-239, 1988.

DUNN, P. P. J.; BILLINGTON, K.; BUMSTEAD, J. M.; TOMLEY, F. M. Isolation and sequences of cDNA clones for cytosolic and organellar hsp70 species in *Eimeria spp.* *Molecular and Biochemical Parasitology*, 70, p. 211-215, 1995.

FERNANDEZ-ROBLEDO, J. A.; VASTA, G. R. Production of recombinant proteins from protozoan parasites. *Trends in Parasitology*. Vol. 26, n. 5, p. 244-254, 2010.

GARCIA, J.L.; NAVARRO, I.T.; VIDOTTO, O.; GENNARI, S.M.; MACHADO, R.Z.; PEREIRA, A.B.L.; SINHORINI, I.L. *Toxoplasma gondii*: Comparison of a rhoptry-ELISA with IFAT and MAT for antibody detection in sera of experimentally infected pigs. *Experimental Parasitology*, v. 113, p. 100-105, 2006.

GARCIA, J. L.; GUIMARÃES JUNIOR, J. S.; BOGADO, A. L. G.; BUNGNI, F. M.; RAMALHO, D. C.; SOUZA, L. M. *Eimeria tenella*: utilization of a nasal vaccine with sporozoite antigens incorporated into iscom as protection for broilers breeders against a homologous challenge. *Experimental Parasitology*. 120, 185-190, 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 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. 210-216, 2010.

INNES, E. A.; VERMEULEN, A. N. Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites *Eimeria*, *Toxoplasma* and *Neospora*. *Cambridge Journals: Parasitology*, 133, 145-168, 2006.

KNOX, D. P.; REDMOND, D. L. Parasites vaccines - recent progress and problems associated with their development. *Cambridge Journals: Parasitology*, 133, 1-8, 2006.

LAURENT, F.; BOURDIEU, C.; YVORÉ, P.; PÉRY, P. Cloning and expression of cDNA encoding an *Eimeria acervulina* 70kDa sporozoite protein which is related to the 70kDa heat-shock protein family. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 66, p. 349-352, 1994.

LONG, P.L. Maintenance of intestinal protozoa in vivo with particular reference to *Eimeria* and *Histomonas*. In: Taylor, A.E.R., Muller, R. (Eds.), *Isolation and Maintenance of Parasites In Vivo*. *Blackwell Scientific Publication*, Oxford, p.65-75, 1971.

MA, D. Vaccination of chickens with DNA vaccine encoding *Eimeria acervulina* 3-1E and chicken IL-15 offers protection against homologous challenge. *Experimental Parasitology*, v.127, n.1, p.208-214, 2011.

MARTINS, G. F.; BOGADO, A. L. G.; GUIMARÃES JÚNIOR, J. S.; GARCIA, J. L. O uso de vacinas no controle da coccidiose aviária. *SEMINA: Ciências Agrárias*, v. 28, n. 1, p. 97-104, 2012.

MATSUBAYASHI, M.; HATTA, T.; MIYOSHI, T.; MAN, A.; SASAI, K.; SHIMURA, K.; ISOBE, T.; KITA, K.; TSUJI, N. High-throughput RNA sequencing profiles and transcriptional evidence of aerobic respiratory enzymes in sporulating oocysts and sporozoites of *Eimeria tenella*. *Infection, Genetics and Evolution*, 18, 269-276, 2013.

MOHAMED, R. M.; AOSAI, F.; CHEN, M.; MUN, H. S.; NOROZE, K.; BELAL, U. S.; PIAO, L. X.; YANO, A. Induction of protective immunity by DNA vaccination with *Toxoplasma gondii* HSP70, HSP30 and SAG1 genes. *Vaccine*, 21, 2852-2861, 2003.

PEROVAL, M.; PERY, P.; LABBE, M. The heat shock protein 90 of *Eimeria tenella* is essential for invasion of host cell and schizont growth. *International Journal for Parasitology*, n.36, n.10-11, p.1205-1215, 2006.

ROSE, M.E., MOCKETT, A.P. Antibodies to coccidia: detection by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Parasite Immunology*, v.5, n.5, p.479–489, 1983.

SATHISH, K.; SRIRAMAN, R.; SUBRAMANIAN, B. M.; RAO, N. H.; KASA., B.; DONIKENI, J.; NARASU, M. L.; SRINIVASAN, V. A. Plant expressed coccidial antigens as potential vaccine candidates in protecting chicken against coccidiosis. *Vaccine*, 30, 4460-4464, 2012.

SHI, W.; LIU, Q.; ZHANG, J.; SUN, J.; JIANG, X.; GENG, J.; WANG, F.; XIAO, Y.; LI, H.; ZHAO, X. Co-expression of EtMIC2 protein and chicken interleukin-18 for DNA vaccine against chicken coccidiosis. *Research in Veterinary Science*, 97, 64-70, 2014.

SCHMATZ, D.M.; CRANE, M.S.J.; MURRAY, P.K. Purification of *Eimeria* sporozoites by DE-52 anion exchange chromatography. *Journal of protozoology*. v.31, n.1, p.181-183, 1984.

ZHANG, L.; MA, L.; LIU, R.; ZHANG, Y.; ZHANG, S.; HU, C.; SONG, M.; CAI, J.; WANG, M. *Eimeria tenella* heat shock protein 70 enhances protection of recombinant microneme protein MIC2 subunit antigen vaccination against *E. tenella* challenge. *Veterinary Parasitology*, 188, 239-246, 2012.

ZHANG, J.; CHEN, P.; SUN, H.; LIU, Q.; WANG, L.; WANG, T.; SHI, W.; LI, H.; XIAO, Y.; WANG, P.; WANG, F.; ZHAO, X. *Pichia pastoris* expressed EtMIC2 protein as a potential vaccine against chicken coccidiosis. *Veterinary Parasitology*, 205, 62-69, 2014a.

ZHANG, Z. C.; HUANG, J. W.; LI, M. H.; SUI, Y. X.; WANG, S.; LIU, L. R.; XU, L. X.; YAN, R. F.; SONG, X. K.; LI, X. R. Identification and molecular characterization of

microneme 5 of *Eimeria acervulina*. *PLoS One*, 9 (12):
e115411.[doi:10.1371/journal.pone.01155411](https://doi.org/10.1371/journal.pone.01155411), 2014b.

Figura 1 - Produtos amplificados através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) respectivos aos gene HSP70 - Gel de Agarose a 1,5% (SYBER GREEN®). Coluna 1: padrão de peso molecular 100pb (NEB, New England); Coluna 2: controle negativo; Coluna 3: fragmento amplificado a partir do cDNA; Coluna 4: fragmento amplificado a partir do plasmídeo pTrc2His/hsp70 da colônia que expressou a proteína rHSP70.

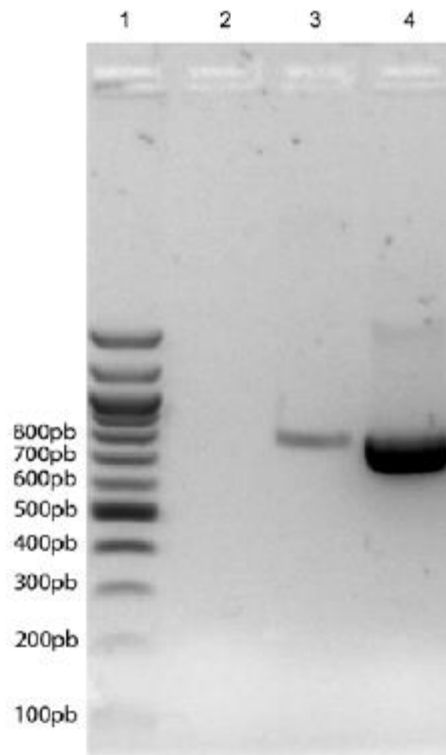


Figura 2 - Proteína recombinante rHSP70 purificada em condições desnaturantes - Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%. Coluna 1: peso molecular; Coluna 2: lisado de bactérias; Coluna 3: lisado de bactérias após passagem pela coluna de resina de níquel; Coluna 4: primeira eluição; Coluna 5: segunda eluição.

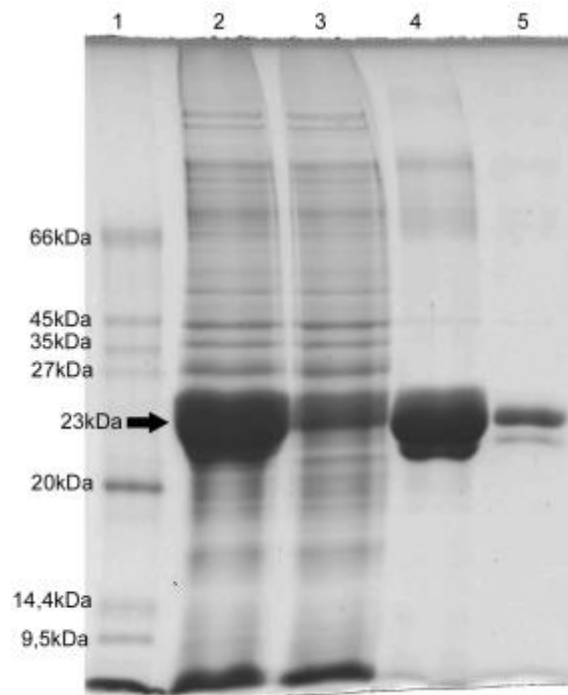


Figura 3 - Titulação de anticorpos (IgY) anti-rHSP70 nos diferentes tratamentos nos dias de pré (21° dia de experimento) e pós desafio (28° dia de experimento). G1: rHSP70; G2: Adjuvante; G3: Ctrl (+); G4: Ctrl (-)

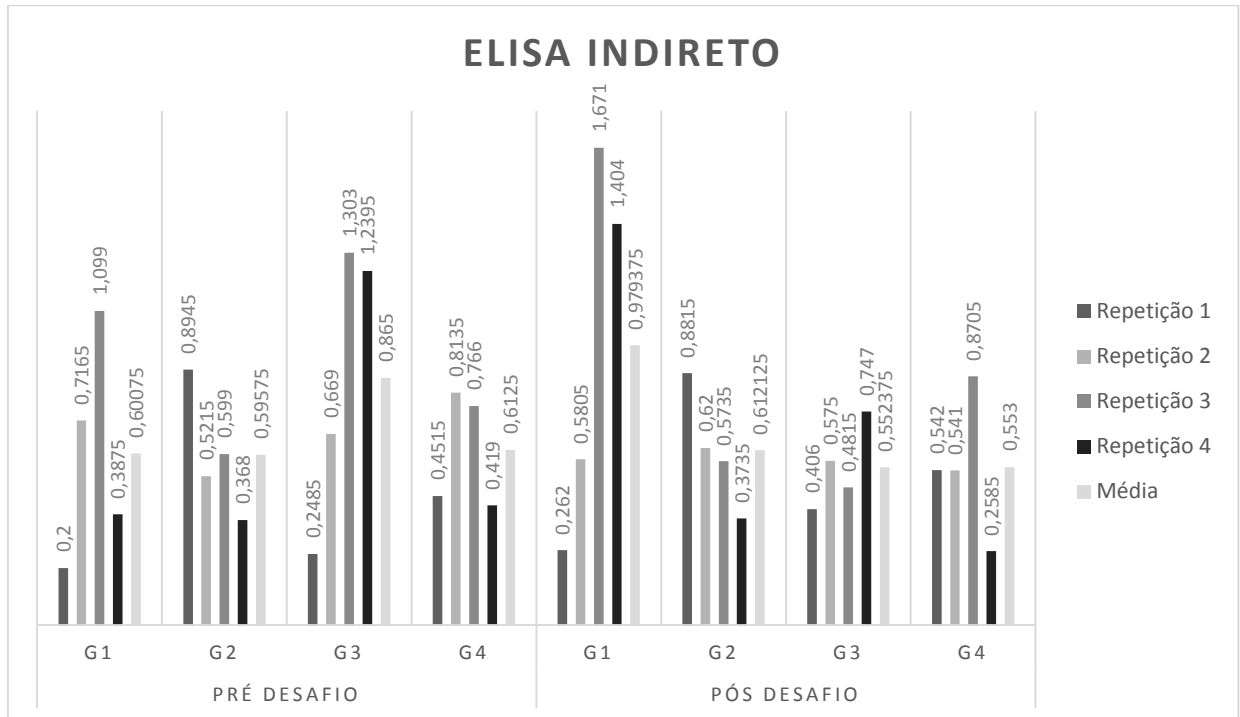


Tabela 1 - Parâmetros associados a proteção com base na média±desvio padrão do ganho de peso médio, média do índice de conversão alimentar, mediana da eliminação de oocistos, porcentagem da taxa de fecundidade e média de escore de lesão cecal, calculados uma semana pós-desafio.

Tratamento	Ganho de peso (g±DP)	Índice de Conversão Alimentar	Eliminação de oocistos (x10 ⁸ ±DP)	Taxa de Fecundidade (%)	Escore de lesão cecal
G1	416±6,6	1,77	25,07 ^a	67,29	0,62 ^{ab}
G2	405±183	1,85	11,72 ^{ab}	30,03	0,62 ^{ab}
G3	396±33,6	1,79	8,20 ^{ab}	0	0,75 ^a
G4	405±7,75	1,83	0,00 ^b	NC	0 ^b
Valor de p	0,55	-	0,0162	0,37	0,0137

G1: rHSP70; G2: Adjuvante; G3: Ctrl (+); G4: Ctrl (-); DP=desvio padrão; NC=não calculado.

APÊNDICE

Extração de DNA Qiagen™

1. 200 µL da amostra de sangue total com EDTA do bezerro experimentalmente infectado com o a cepa PR-1 de *Anaplasma marginale* em um microtubo de 2 mL e adicionar 20 µL de proteinase K.
2. Adicionar 200 µL do buffer AL, homogeneizar em vortex por 15 segundos.
3. Incubar por 10 minutos a 56°C.
4. Centrifugar por 10-20 segundos.
5. Adicionar 200 µL de etanol, homogeneizar por em vortex por 15 segundos e centrifugar brevemente.
6. Cuidadosamente colocar o conteúdo do microtubo na coluna com o coletor de 2 mL e centrifugar a 6000xg por 1 minuto.
7. Descartar o conteúdo que passou pela coluna e adicionar 500 µL do buffer Aw-1.
8. Centrifugar a 6000xg por 1 minuto.
9. Descartar o conteúdo do coletor e adicionar 500 µL do buffer AW-2. Centrifugar com a velocidade de 20000xg por 3 minutos. Trocar o coletor da coluna e centrifugar por 15-20 segundos.
10. Colocar a coluna em microtubo de 1,5 mL, adicionar 200 µL do buffer AE e incubar a temperatura ambiente por 1-5 minutos.
11. Centrifugar a 6000xg por 1 minuto.
12. Estocar o DNA extraído a -20°C.

Gel de agarose

1. Pesar a agarose em um erlenmeyer, adicionar 30 ml de TEB 1X (89 mM tris-base; 89 mM ácido bórico; 2 mM de EDTA) e leve ao forno microondas até a fusão da agarose.
2. Adicionar 3 µL de SYBER GREEN quando a solução estiver morna.
3. Colocar a agarose em recipiente previamente preparado para a solidificação.

<i>Concentração do gel</i>	1%	1,5%	2%
Agarose	0,3g	0,45g	0,6g
TEB [1x]	30 mL	30 mL	30 mL
SYBER GRENN	3 µL	3 µL	3 µL

TEB [5X] solução estoque

Tris-base	54 g
Ácido bórico	27 g
EDTA	2,65 g
Água destilada	1000 mL

Corante para corrida eletroforética em agarose

Ficoll	1,25 g (armazenada a vácuo)
Azul de bromofenol (AB)	0,0125 g
TEB [5X]	10 mL

Ficoll	1,5 g (armazenada a vácuo)
Xylenecyanol	0,0125 g
Água destilada	10 mL

Reação em cadeia da polimerase (PCR)*Mix PCR [2X] concentração de 1,5 mM*

Tampão PCR 1X (40 mM Tris- HCl pH 8,0, 100 mM KCl)	200 µL
MgCl ₂	60 µL
dNTPs (100 mM)	4 µL de cada
Água Milliq	724 µL

Mix PCR [2X] concentração 2,0 mM

Tampão PCR 1X (40 mM Tris- HCl pH 8,0, 100 mM KCl)	200 µL
MgCl ₂	80 µL
dNTPs (100 mM)	4 µL de cada
Água Milliq	544 µL

Mix PCR [2X] concentração 2,5 mM

Tampão PCR 1X (40 mM Tris- HCl pH 8,0, 100 mM KCl)	200 µL
MgCl ₂	100 µL
dNTPs (100 mM)	4 µL de cada
Água Milliq	684 µL

PCR protocolo 1 reação total 25 µl

Mix [2X]	12,5 µL
Primer F	1 µL
Primer R	1 µL
Taq polimerase	0,25 µL
Água Milliq	5 µL
DNA extraído	5 µL

Competência da *E. coli* BL21/TOP10

1. Pré-inóculo: Inocular 30µL da *E. coli* BL21 em 3 mL de caldo LB, incubar a 37°C overnight, sob agitação.
2. Inocular 200µL (300µL) do pré-inóculo de BL21 em 20 mL de caldo LB e incubar a 37°C, sob agitação, por ± 2 horas, até a obtenção de DO₆₀₀ = 0,5.
3. Centrifugar a 5000 rpm a 4°C por 5 min.
4. Ressuspender em 6,7 mL de tampão de transformação (TT) com MÊS

- usar pipeta de vidro ou ponteira do pipetador regulável resfriadas no freezer, de preferência overnight
- 5. Incubar em gelo por 20 min.
- 6. Centrifugar a 5000 rpm a 4°C por 5 min.
- 7. Ressuspender em 1,6 mL de TT.
 - usar pipeta de vidro ou ponteira do pipetador regulável resfriadas no freezer, de preferência overnight
- 8. Adicionar 15% de glicerol a 100% estéril ao volume das alíquotas a serem congeladas (15 µL de glicerol para 100µL da cultura).
- 9. Aguardar 30 minutos incubados no gelo para iniciar a transformação ou congelar em freezer -80°C até o uso.

Caldo Luria Bertani (LB)

Triptona.....10 g
 NaCl.....5 g
 Extrato de levedura.....5 g
 Água destilada.....1L

Tampão de Transformação (TT)

KCl.....0,74 g
 CaCl₂.....0,75 g

Dissolver em 80 mL de água Milliq e autoclavar por 20 minutos.

Diluir 0,2 g de MÊS[2(N-morpholino) ethane sulfonic acid] em 15 mL de água Milliq e filtrar na solução anterior gelada e no fogo para evitar contaminação.

Transformação do *E. coli* BL21/TOP10

1. Adicionar 2-4 µL de plasmídeo recombinante (vetor + DNA inserido) em 100 µL de célula competente. Misture delicadamente utilizando o pipetador com movimentos circulares (sem pipetar de cima para baixo).
2. Incubar no gelo por 30 minutos.
3. Efetuar choque térmico por 1 minuto a 42°C.
4. Transferir imediatamente no gelo.
5. Adicionar 250 µL de meio SOC ou LB a temperatura ambiente.
6. Tampar o tubo firmemente prendê-lo inclinado para aumentar a superfície de aeração. Agitar o tubo horizontalmente (200 rpm) a 37°C por 1 hora.
7. Semear 100 µL da célula competente em Agar LB com antibiótico adequado, com alça de drigalski e incubar overnight.
8. Adicionar 250 µL da célula transformada em 20 mL de Caldo LB contendo antibiótico, incubar a 37°C overnight.

Meio SOC

Triptona 2%
 Extrato de levedura 0,5%
 NaCl 2,5 mM
 KCl 2,5 mM
 MgCl₂ 10 mM
 MgSO₄ 10 mM
 Glicose 20 mM

Western Blotting

1. Retirar a membrana de nitrocellulose do tampão de transferência;
2. Enquanto seca a membrana de nitrocelulose, marcar com um lápis, os respectivos pesos moleculares do padrão;
3. Reidratar a membrana em água destilada;
4. Bloquear a membrana com o tampão de bloqueio (PBS + 0.1% Tween 20 + 5% leite em pó desnatado) por, pelo menos, 1 hora em agitador à temperatura ambiente;
5. Lavar a membrana em PBS-T (PBS +0,1% Tween 20) 3 x 10 minutos em agitador à temperatura ambiente;
6. Incubar com o anticorpo por 1 hora diluídos em tampão de bloqueio pH 7,2 em agitador à temperatura ambiente;
 - Soro total de bovino experimentalmente infectado (PR1) diluído 1:500
7. Lavar a membrana em PBS-T 5 vezes por 10 minutos em agitador à temperatura ambiente;
8. Incubar com anticorpo anti-proteína G, na proporção de 1:1000 por 1 hora em agitador à temperatura ambiente;
9. Lavar 5 vezes por 10 minutos em agitador à temperatura ambiente;
10. Revelar a reação com DAB 5mg/15 mL PBS e 150 µL de Hidrógeno peróxido 30%.

PBS-Tween 20 pH 7,2 – 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 Milli-Q q.s.p.	1000 mL

Tampão de Bloqueio (100 mL)

PBS-Tween 20 pH 7,2 – 7,4	100 mL
Leite em Pó Mólico	5 g

Tampão de Transferência (2000 mL)

Tris Base	6,82 g
Glicina	32,4 g
Metanol	450 mL
H ₂ O Milli-Q q.s.p.	2000 mL

Gel SDS-Poliacrilamida

Gel separador (Slab gel) 12%

Água destilada	2,75 mL
Tris/SDS pH8,8	2,03 mL
Acrilamida 30%	3,2 mL
Persulfato de amônio	80 µL
TEMED	3,2 µL

Gel concentrador (Stacking gel) 5%

Água destilada	1,68 mL
Tris/SDS pH6,8	0,75 mL
Acrilamida 30%	0,54 mL
Persulfato de amônio	15 µL
TEMED	1,5 µL

Tris/SDS 1,5M pH 8,8

Tris	18,171 g
SDS	0,4 g
Água milliq	60 mL

Ajustar o pH para 8,8 com HCl 10N, deixar overnight na geladeira e conferir o pH no outro dia, completar para 100 mL.

Tris/SDS 0,5M pH 6,8

Tris	6,055 g
SDS	0,4 g
Água milliq	60 mL

Ajustar o pH para 6,8 com HCl 10N, deixar overnight na geladeira e conferir o pH no outro dia, completar para 100 mL.

Tampão de glicina 1X (Tampão de corrida) pH 8,8

Tris	3g
Glicina	14,4 g
SDS	1g
Água destilada	1000 mL

SDS 10%

Dodecil Sulfato de sódio	10 g
Água milliq	100 mL

Aquecer a 68°C para dissolver

Solução azul bromofenol 0,5%

Azul bromofenol	0,05 g
Água milliq	10 mL

Persulfato de amônio 10%

Persulfato de amônio	10 g
Água milliq	10 mL

Diluição IPTG na concentração de 1M

IPTG	1g
Água milliq	4,2 mL

Acrilamida 30%

Acrilamida	29g
Bis acrilamida	1 g
Água milliq q.s.p	100 mL

Misturar a bis acrilamida em 40 mL de água e agitar por 1 hora acrescentando a acrilamida, agitar até dissolver, completar para 100 mL e corrigir o pH para 7. Armazenar na geladeira em frasco escuro.

Tampão de amostra SDS-PAGE 1X []

Solução Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1,25 mL
Glicerol (100%)	1,00 mL
B-Mercaptoetanol	0,2 mL
Azul bromofenol	0,01g
SDS	0,2 g
Água destilada	10 mL

Tampão de amostra SDS-PAGE 2X []

Solução Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	2,50 mL
Glicerol (100%)	2,00 mL
B-Mercaptoetanol	0,4 mL
Azul bromofenol	0,02 g
SDS	0,4 g
Água destilada	10 mL

Tampão de amostra SDS-PAGE 3X []

Solução Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	3,75 mL
Glicerol (100%)	3,00 mL
B-Mercaptoetanol	0,6 mL
Azul bromofenol	0,03 g
SDS	0,6 g
Água destilada	10 mL

Tampão de amostra SDS-PAGE 4X []

Solução Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	5 mL
Glicerol (100%)	4 mL
B-Mercaptoetanol	0,8 mL
Azul bromofenol	0,04 g
SDS	0,8 g
Água destilada	10 mL

Tampão de amostra SDS-PAGE 5X []

Solução Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1 mL
Glicerol (100%)	1,6 mL
B-Mercaptoetanol	0,4 mL
Azul bromofenol (Sol 0,5%)	0,4 mL
SDS 10%	1,6 mL
Água destilada	3 mL

Corante comassie blue

Comassie brilhante blue R	0,625 g
---------------------------	---------

Metanol	125 mL
Ácido acético	17,5 mL
Água destilada q.s.p.	250 mL

Descorante do comassie blue

Ácido acético	100 mL
Metanol	400 mL
Água destilada	500 mL

ARTIGO PUBLICADO**REVISÃO****Uso de Vacinas no controle da coccidiose aviária**

The use of vaccines for chicken coccidiosis control

Guilherme Felippelli Martins², Alexey Leon Gomel Bogado², José da Silva
Guimarães Junior¹, João Luis Garcia^{1*}

Resumo: O gênero *Eimeria* pertencente ao subfilo Apicomplexa, Família Eimeriidae com sete espécies reconhecidas infectando galinhas: *E.acervulina*, *E.maxima*, *E.tenella*, *E.brunetti*, *E.necatrix*, *E.mitis* e *E.praecox*. Trata-se de um parasito intracelular obrigatório que causa doença pela destruição de células do epitélio intestinal em seu processo de replicação. O uso indiscriminado de anticoccídicos tem resultado na seleção de cepas resistentes a drogas, as quais reduzem a eficácia de vários anticoccídicos usados atualmente no controle dessa parasitose. Como em muitos países a legislação proíbe o uso destes produtos continuamente até o abate, períodos de retirada têm sido exigidos, o que aumenta o risco de infecção no final do período de crescimento. Desta forma, as vacinas são fundamentais como ferramenta de controle destes parasitas. Existem atualmente diversos tipos de vacinas, porém somente vacinas vivas e atenuadas são comercializadas para o controle da coccidiose aviária, com exceção da vacina recombinante CoxAbic[®]. Apesar disso, o seu uso ainda é discreto frente ao uso de anticoccidianos, possivelmente devido a sua menor eficácia e maior custo. Desta forma, é importante ressaltar que o controle da coccidiose aviária é extremamente complexo, e que, novos estudos devem ser estimulados para o desenvolvimento de métodos eficazes, entre eles o uso de vacinas, para a produção de carne de frango livre de medicamentos.

¹ Prof^os. Drs. do Dept^o de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, UEL, C P 6001, 86050-970, Londrina, PR. E-mail: jlgarcia@uel.br, jsgj@uel.br

² Discentes (Doutorandos) do Curso de Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, gfm@uel.br; alexey_leon@yahoo.com.br

*Autor para correspondência

Palavras chave: Eimeriose aviária, vacinas, controle, imunógenos

Abstract: The genus *Eimeria* belonging to the Subphylum Apicomplexa, Family Eimeriidae, have seven recognized species infecting chickens: *E.acervulina*, *E. maxima*, *E.tenella*, *E.brunetti*, *E.necatrix*, *E.mitis* and *E.praecox*. It's an obligate intracellular parasite that causes disease by the destruction of intestinal epithelial cells in the replication process. The indiscriminate use of anticoccidial drugs has resulted in the selection of drug-resistant strains, which reduce the effectiveness of various anticoccidial drugs used currently in control of the disease. As in many countries legislation prohibits the use of these products continuously until slaughter withdrawal periods have been required, which increases the risk of infection at the end of the growing season. Thus, vaccines are essential as a tool for controlling these parasites. There are several types of vaccines, but only attenuated live vaccines are marketed for the control of avian coccidiosis, with the exception of recombinant vaccine CoxAbic®. Nevertheless, its use is still mild compared to the use of anticoccidial drugs, possibly due to its lower cost and greater effectiveness. Thus, it is important that control of avian coccidiosis is extremely complex, and that further studies should be encouraged to develop effective methods, including the use of vaccines for the production of chicken meat free of medication.

Key words: Avian eimeriosis, vaccines, control, immunogens

Introdução

A eimeriose ou coccidiose aviária, é uma parasitose intestinal que acomete diversas espécies de aves tendo como agente etiológico os protozoários do gênero *Eimeria*, sendo estes responsáveis por quadros de diarreia, perda de peso, elevada conversão alimentar, e, em alguns casos mais severos, alta taxa de mortalidade (YIN et al., 2011).

Apesar de potencialmente apresentar um quadro patológico severo, os quadros subclínicos são aqueles que mais causam problemas ao produtor por seu custo econômico. Perdas devidas a eimeriose, na indústria avícola em 1995, foram estimadas em aproximadamente 40 milhões de libras esterlinas sobre uma produção de 625 milhões de frangos no Reino Unido. Nesta estimativa somente 17,5% destas perdas foram atribuídas à custos de profilaxia e tratamento, e cerca de 80% devido a perdas em conversão alimentar e ganho de peso (WILLIAMS, 1999). Segundo Luchese et al. (2007), atualmente, no Brasil, as perdas podem chegar aos US\$ 19 milhões/ ano. Este autor ainda afirma que as perdas podem chegar a US\$1,5 bilhão/ ano no mundo. Isto se dá em decorrência de uma série de fatores tais como: uso incorreto de anticoccídicos, diagnóstico incorreto da enfermidade e/ou espécies de *Eimeria* envolvidas, além da presença de cepas resistentes a determinadas drogas (CHAPMAN, 1994; ZULPO et al., 2007).

O uso indiscriminado de anticoccídicos tem resultado na seleção de cepas resistentes a drogas, as quais reduzem a eficácia de vários anticoccídicos em uso (CHAPMAN, 1997; COOMBS; MÜLLER, 2002; LI et al., 2004). Como em muitos países a legislação proíbe o uso destes produtos continuamente até o abate, períodos de retirada têm sido exigidos, os quais promovem aumento no risco de infecção no final do período de crescimento (VERMEULEN; SCHAAP; SCHETTERS, 2001). Diante da atual estratégia profilática, o Conselho da União Européia propôs a retirada progressiva dos anticoccídicos utilizados como aditivos na alimentação animal, até dezembro de 2012 (UNIÃO EUROPÉIA, 2003). Segundo a União Brasileira de Avicultura (UBABEF), o Brasil é o maior exportador do mundo de carne de frango. No ano de 2010 foram exportadas 3,8 milhões de toneladas, sendo 12,34% deste montante destinados a União Européia (UBABEF, 2010). Desta forma, existe uma necessidade de novos conceitos estratégicos para o controle da eimeriose aviária

(VERMEULEN; SCHAAP; SCHETTERS, 2001).

Existe, atualmente, uma mudança comportamental da população consumidora, que busca e exige produtos que não apresentem resíduos de agentes químicos (VERMEULEN; SCHAAP; SCHETTERS 2001).

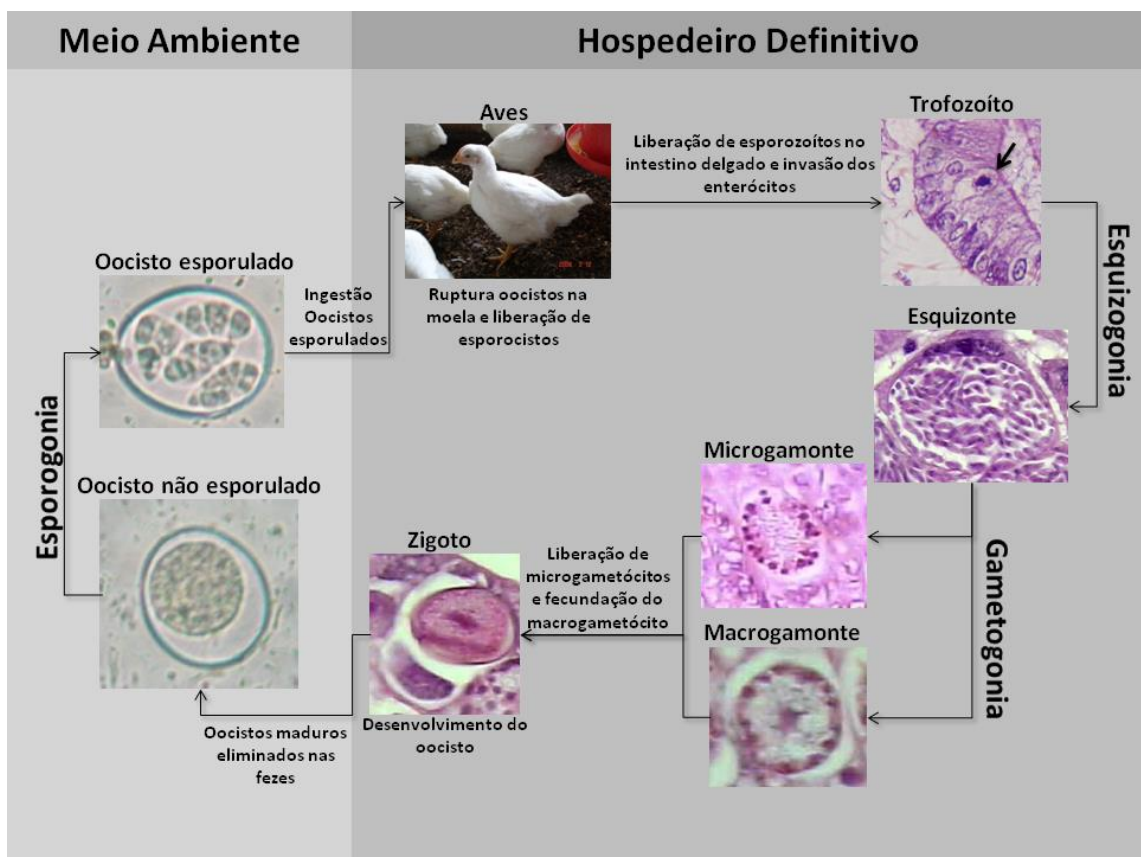
Eimeria spp.

Eimeria é um protozoário pertencente ao subfiló Apicomplexa, Família Eimeriidae, que apresenta várias espécies de interesse médico veterinário, podendo afetar mamíferos e aves. Sete espécies têm sido reconhecidas infectando galinhas: *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*, *E. brunetti*, *E. necatrix*, *E. mitis* e *E. praecox*. Cada uma delas com características próprias em relação à prevalência, local de infecção, patogenicidade e imunogenicidade (GUIMARÃES JÚNIOR et al., 1991; CARDOZO; YAMAMURA, 2006; ZULPO et al., 2007). A *E. tenella* é uma das mais patogênicas das sete espécies que infectam galinhas, invadindo a mucosa cecal, causando inflamação e danos aos enterócitos (MIN et al., 2004).

Trata-se de parasito intracelular obrigatório que causa doença pela destruição das células em seu processo de replicação. Possuem duas etapas de multiplicação, uma assexuada (fase mais patogênica) e outra sexuada (KINNAIRD et al., 2004; CACHO et al., 2004). O ciclo de vida (Figura 1) é dividido em três fases: esporogonia (processo de esporulação dos oocistos, que ocorre no meio ambiente), merogonia (esquizogonia) e gametogonia (que ocorre no organismo do hospedeiro) (LILLEHOJ et al., 2000a). Os oocistos esporulados em material contaminado (cama, água, ração) são ingeridos pelos animais. A sua parede é destruída na moela por força mecânica, liberando os esporocistos que serão digeridos pelas enzimas digestivas, liberando a forma que invadirá a célula hospedeira: o esporozoíto. Dentro dos enterócitos, o esporozoíto sofre sucessivas divisões até a formação do meronte (esquizonte). Após a maturação este meronte rompe a célula liberando os merozoítos que invadem outras células repetindo o processo por 2 a 4 gerações, dependendo da espécie. Após esta fase, os merozoítos invadem novas células e diferenciam-se em micro e macrogametócitos, os quais irão se unir e formar o zigoto que dará origem ao oocisto,

que é liberado no meio ambiente junto com as fezes. Este oocisto, sob condições ótimas de umidade, temperatura e oxigênio esporulam (entre 18 a 30 horas, dependendo da espécie), tornando-se infectantes. (KINNAIRD et al., 2004; CACHO et al., 2004).

Figura 1. Ciclo de vida de *Eimeria spp.* em frangos de corte.



Fonte: Elaborado pelos autores

Aspectos imunológicos das aves e vacinas

A infecção por *Eimeria* induz uma resposta imune complexa e multifatorial no hospedeiro, embora esteja claro que muitas destas respostas não são essenciais na proteção contra desafio subsequente (SHIRLEY; SMITH; BLAKE, 2007). Devido a infecção ser confinada ao trato intestinal, o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) exerce a primeira linha de defesa contra o agente tendo três funções principais, como o processamento e apresentação de antígenos, a produção de anticorpos intestinais (IgA), e a ativação da imunidade mediada por células (LILLEHOJ

et al., 2000a).

Segundo Shirley, Smith e Blake (2007), a caracterização dos mecanismos imunes responsáveis pela proteção, tanto na infecção primária quanto na secundária, pela maioria das espécies de *Eimeria*, mostram o papel crítico das células T (CD4+), principalmente aquelas que expressam receptores $\alpha\beta$, e interferon gama (IFN- γ). Este último foi identificado em altas concentrações nas infecções por *E. acervulina*, *E. maxima*, e *E. tenella*. Ainda segundo estes autores, as células B e *natural killer* parecem exercer um papel menos importante na promoção de imunidade efetiva. Constantinoiu et al. (2011), reforçam a importância das células T na promoção de imunidade protetora na infecção de aves pelo gênero *Eimeria*.

Trout e Lillehoj (1996), descreveram que a resposta humoral não exerce um papel fundamental na proteção contra infecção, porém aponta para a importância da imunização materna e transferência de imunidade passiva.

A natureza exata dos mecanismos de defesa do hospedeiro frente a estes parasitos ainda permanece desconhecida, porém sabe-se que diversas proteínas, de diferentes organelas são importantes no processo de invasão celular e desenvolvimento da infecção, que poderiam estimular a resposta imune celular e prover proteção frente a infecção (KLOTZ, 2007). Devido a este fato, a utilização de vacinas atenuadas proporciona uma imunidade mais eficiente em comparação as vacinas de subunidades (mortas/ inativadas). Porém este tipo de vacina tem o inconveniente da possibilidade de manifestação clínica da doença (LILLEHOJ et al., 2000a). Assim, com o advento da biologia molecular, diversos estudos têm sido desenvolvidos nesta área, visando a estimulação específica de células promotoras de imunidade consistente (LAMPHEAR, et al., 2002).

A imunidade conferida pelas vacinas vivas de baixa dose e atenuadas é protetora, pois permite o desenvolvimento completo do ciclo do parasito e, conseqüentemente, estimula todas as vias da resposta imune, principalmente a resposta imune celular, a qual promove efetivamente a proteção contra infecções subseqüentes. Já a imunidade pelas vacinas recombinantes irá depender da proteína utilizada, sendo esta, de preferência, participante de etapas fundamentais no ciclo do parasito (LILLEHOJ et al., 2000a).

Os últimos 10 anos de pesquisa no desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra diversos parasitos apicomplexos (*Eimeria*, *Plasmodium*, e *Toxoplasma*) revelaram a complexidade da relação parasito-hospedeiro, e indicam como caminho mais promissor o uso de antígenos recombinantes de proteínas de organelas específicas (presentes no complexo apical, como roptrias, micronemas e granulos densos) envolvidas no processo de invasão celular (JENKINS, 1998).

Existem diversos tipos de vacinas, porém somente vacinas vivas e atenuadas são comercializadas (exceção a vacina recombinante CoxAbic®). Apesar disso, o seu uso ainda é discreto frente ao uso de anticoccidianos, possivelmente devido a sua menor eficácia e maior custo (DALTON; MULCAHY, 2001).

Vacinas vivas

As vacinas vivas atualmente utilizadas no controle da coccidiose aviária são as atenuadas ou as produzidas com cepas virulentas. A vantagem das atenuadas em relação as cepas virulentas, consiste na menor possibilidade de lesão intestinal, devido ao seu menor potencial reprodutivo e, ao mesmo tempo, conferindo maior imunidade aos animais (TOMASI, 2006).

As vacinas contendo cepas virulentas foram as primeiras utilizadas no controle da coccidiose, pois foi observado que o uso dessas cepas em uma sub-dose conferia imunidade protetora frente a um posterior desafio. Essas vacinas são utilizadas até hoje administradas de diferentes formas e veículos, sendo algumas através da água, outras em gel, através de spray, entre outros meios de aplicação. Existem diversas formas de se modular a patogenicidade destas cepas, como por meio da passagem em ovo embrionado, co-administração com anticoccídicos, baixa dose, entre outros. (LILLEHOJ et al., 2000a).

Segundo Lillehoj et al. (2000a), as cepas atenuadas são obtidas através de sucessivas passagens em ovos embrionados, seleção de cepas precoces e irradiação. Ainda segundo este autor, além destas três formas de atenuação, outras técnicas têm sido desenvolvidas, como a seleção de parasitas de diferentes locais do intestino e imunização com parasitos cultivados *in vitro*. No entanto estas técnicas

mostraram ser menos eficientes que as técnicas de seleção de cepas precoces e as que sofreram irradiação.

Segundo Dalton e Mulcahy (2001), existem quatro vacinas atualmente no mercado, sendo duas delas vivas atenuadas (Paracox® e Livacox®) e duas com cepas virulentas (Coccivax® e Immunocox®). As cepas atenuadas são obtidas após sucessivas passagens até obtenção de linhas precoces e pouco patogênicas (SHIRLEY; SMITH; BLAKE, 2007). Porém, apesar da promoção da imunidade, neste tipo de vacina, existe a possibilidade de reversão da atenuação e desenvolvimento de lesões mais intensas, que podem acarretar em perda de peso. Este tipo de vacina vem sendo mais utilizado na imunização de poedeiras e matrizes de reposição (DALTON; MULCAHY, 2001).

Além da reversão da atenuação, outro problema em relação as vacinas vivas está ligado ao mecanismo de infecção e o desenvolvimento da imunidade. Para que as aves desenvolvam imunidade protetora, os esporozoítos precisam invadir as células e realizar seu ciclo celular para que haja a estimulação do sistema imune celular (efetivamente protetor). Isso vale tanto para a infecção natural quanto para as vacinas atenuadas. Então, para que as vacinas surtam o efeito desejado, os parasitos precisam invadir as células intestinais e realizar seu ciclo. Levando este fato em consideração, é notório que o uso de coccidiostáticos (que impedem o ciclo destes parasitos), interferiria no desenvolvimento da imunidade. Então, quando se usa este tipo de vacinas, não se deve utilizar em conjunto com estas drogas, caso contrário ocorrerá uma maior suscetibilidade destes animais caso se tornem infectados com cepas naturais.

Vacinas inativadas

Esta classe de vacina envolve as vacinas de organismos mortos ou inativados e antígenos de superfície (LILLEHOJ et al., 2000a).

Nestas vacinas são usados fragmentos de *Eimeria* spp, principalmente esporozoítos (por ser a forma infectante), ou mesmo fragmentos de oocistos. Porém, o uso deste tipo de vacina tem a característica de estimular uma resposta imune

humoral, a qual não exerceria uma proteção tão satisfatória quanto à resposta celular (TIZARD, 2002). Em contrapartida, Garcia et al. (2008), demonstraram uma diminuição nos escores de lesão, eliminação de oocistos e lesão tecidual utilizando uma vacina com subunidades de esporozoítos administrada por via nasal.

Vacinas de proteínas e DNA recombinantes

Há cerca de duas décadas diversos laboratórios concentraram esforços no desenvolvimento de uma vacina contra coccidiose aviária utilizando antígenos recombinantes de diferentes estágios de desenvolvimento (esporozoítos, merozoítos, gametócitos) de *Eimeria* spp. Essas seqüências de DNA são expressas em uma variedade de vetores eucarióticos e procarióticos (JENKINS, 2001). Segundo Shirley, Smith e Blake. (2007), a utilização de antígenos para confecção de vacinas, deve utilizar um veículo, que pode ser um vetor vivo, um DNA recombinante, ou mesmo uma proteína expressa e purificada.

A identificação dos estágios do ciclo de vida do parasita é o passo mais importante na escolha das proteínas a serem utilizadas na confecção de uma vacina recombinante. Os esporozoítos são preferidos pela facilidade de obtenção e por estarem envolvidos diretamente no processo de invasão celular (LILLEHOJ et al., 2000a). A escolha da proteína a ser utilizada ainda depende de alguns fatores, como a tecnologia para produção em escala, a imunogenicidade do produto recombinante e modificações pós-translacionais (ex. glicosilação) (FERNÁNDEZ-ROBLEDO et al., 2010).

Boghal et al. (1992) induziram proteção parcial em frangos jovens utilizando proteína recombinante de *E. tenella* e *E. acervulina* experimentalmente infectados. Os autores descreveram ainda estímulo da imunidade celular e um grau razoável de proteção nos animais. Este trabalho foi a primeira descrição de pintos de um dia de idade vacinados com proteínas recombinantes.

Atualmente, existe apenas uma vacina comercial com proteínas recombinantes para o controle da coccidiose aviária, a CoxAbic®. Esta vacina consiste de proteínas recombinantes obtidas de gametócitos de *Eimeria máxima*. Os genes

gam56 e *gam82* foram clonados (pTRCHisB), e suas proteínas expressas em vetor biológico (*E. coli* TOP10), e, posteriormente, purificadas (BELLI et al., 2004).

As possibilidades na confecção de vacinas cresceram com o uso de banco de dados de proteínas na internet (GeneBank). Klotz et al. (2005) identificaram proteínas (secretórias e de superfície) já reconhecidas de outros parasitos Apicomplexa como possíveis candidatas a vacinas devido sua homologia com *Eimeria tenella*.

Proteínas intracelulares secretórias e estruturais

Os antígenos intracelulares de *Eimeria* desempenham importantes papéis na relação parasito-hospedeiro e no ciclo de vida do parasito, sendo assim, são considerados melhores candidatos a confecção de vacinas, por bloquearem as atividades relacionadas ao processo de invasão celular. Entre estes, estão os componentes dos corpos refratários e organelas do complexo apical (LILLEHOJ et al., 2000a).

Aparentemente, diversas proteínas associadas ao complexo apical estão envolvidas no processo de invasão celular e formação do vacúolo parasitóforo. A clonagem de genes que codificam as proteínas associadas às roptrias, micronemas e grânulos densos forneceu informações de eventos que ocorrem durante e após a invasão celular (JENKINS, 1998). Proteínas de micronema têm sido utilizadas na confecção de vacinas recombinantes, como a EtMIC2 (DALLOUL et al., 2005) e EtMIC1 (SUBRAMANIAN et al., 2008). Alguns autores utilizaram partes de regiões consideradas imunogênicas de algumas proteínas, como o antígeno 5401 da região C-terminal da proteína de micronema EtMIC4 (DANFORTH et al., 1989; DU; HU; WANG, 2005).

Outra organela presente no complexo apical são as roptrias. Esta organela, localizada na região anterior do complexo apical, possui um compartimento com um repertório distinto de proteínas envolvidas diretamente na invasão da célula hospedeira (PROELLOCKS; COPPEL; WALLER, 2010). No entanto, apesar da sua importância neste evento, não existem muitos estudos utilizando proteínas desta organela na imunização de aves, com exceção da proteína EAMZp30-47, obtida de

merozoítos de *Eimeria acervulina*, a qual evidenciou o estímulo das células T de aves (JENKINS et al., 1990).

Os corpos refratários são estruturas específicas dos parasitos da família Eimeriidae, desprovidos de membrana. Apesar de terem sido estudados anteriormente e detectados nos estágios sexuais precoces (de esporozoíto à esquizonte de primeira geração), suas funções permanecem desconhecidas (VENEVELLES et al., 2006). Uma proteína de corpo refratário de *E. tenella* (Etp28) foi clonada e expressa em grande quantidade em sistema de expressão por *Baculovirus* (YANG et al., 1998), sendo, esta descrita pelos autores como imunoprotetora e candidata a vacina para combater a coccidiose aviária. Outro antígeno de corpo refratário, SO7, derivado de gene homônimo, também tem sido estudado na confecção de vacinas (POGONKA, et al., 2003; YANG et al., 2010).

Além disso, outras proteínas, a princípio estruturais e com outras funções, têm sido reconhecidas no processo de invasão celular, como as proteínas de choque térmico HSP70 (CACHO et al., 2008) e HSP90 (DASZAK, 1999; PÉROVAL; PERY; LABBE, 2006), mostrando-se possíveis candidatas a estudos futuros.

Proteínas superficiais estruturais

Os antígenos de superfície são importantes na confecção de vacinas por desempenharem um papel direto na interação parasito-hospedeiro, e resultados promissores foram observados utilizando antígenos superfície (membrana celular) nativos e recombinantes (LILLEHOJ et al., 2000a).

Estas proteínas de membrana são obtidas, preferencialmente, de esporozoítos ou merozoítos, por serem as formas infectantes do parasito. São amplificadas de genes, como cSZ-1 (esporozoíto) e cMZ-8 (merozoíto), e tem a propriedade de estimularem a imunidade humoral e celular *in vitro* (JENKINS; LILLEHOJ; DAME, 1988). Li et al. (2010), em um trabalho mais recente, verificou uma significativa diminuição em lesões intestinais, perda de peso e eliminação de oocistos em infecção experimental por *E. tenella*, imunizando aves com uma proteína (cSZ-2) de *E. acervulina*. Shah et al. (2010), utilizando a mesma proteína e sob as mesmas

condições, observaram resultados semelhantes.

Recentemente outra proteína vem sendo utilizada em estudos para imunógenos, a proteína 3-1E, presente na superfície de esporozoítos e esquizontes de *Eimeria acervulina*, e que demonstrou ser altamente imunogênica, produzindo proteção imune parcial contra a coccidiose (MA, et al., 2011). Assim como a proteína 3-1E, outra proteína também de superfície tem sido amplamente utilizada em testes vacinais, a proteína TA4, também conhecida como SAG1. Esta proteína obtida de *E. acervulina* ou de *E. tenella*, mostrou ser eficiente na promoção de imunidade protetora a coccidiose, quando submetidas a desafios homólogo e heterólogo, associadas a interleucinas e outras citocinas como compostos adjuvantes (LILLEHOJ et al., 2000b; MIN et al., 2002; XU et al., 2008; SONG et al., 2009).

Em outro estudo, Geriletu e Xurihua (2011), obtiveram resultados satisfatórios imunizando aves com uma proteína de superfície de merozoíto, denominada MZ5-7, associada a uma interleucina IL-17 de frangos.

DNA recombinante

Vacinas de DNA utilizam genes que codificam proteínas imunogênicas de patógenos (gene de interesse carregado por vetor biológico, como plasmídeo bacteriano ou DNA viral) ao invés das proteínas já expressadas. Elas são utilizadas em conjunto com elementos regulatórios apropriados como os promotores e os estimuladores, permitindo que a proteína codificada seja expressa e, assim, ser reconhecida pelo sistema imune do hospedeiro de uma forma que simule a infecção natural. Este tipo de vacina requer a transferência de genes e expressão do antígeno em tecidos acessíveis ao sistema imunológico, como pele, músculo e mucosas (LILLEHOJ et al., 2000a).

Este tipo de vacina pode ser confeccionada utilizando somente plasmídeo clonado (MIN et al., 2002; XU et al., 2008; SONG et al., 2009; SHAH et al., 2010) ou um vetor biológico portando o gene que codifica a proteína desejada (YANG et al., 2010), ou mesmo, a proteína expressada.

Adjuvantes

Os adjuvantes são utilizados com intuito de aumentar a resposta imune das vacinas, e também em imunologia experimental. A existência de efeitos adjuvantes foi descrito pela primeira vez por Glenny et al. 1926. A natureza química, modo de ação e efeitos colaterais dos adjuvantes são altamente variáveis. Alguns efeitos colaterais podem ser atribuídos à estimulação de diferentes mecanismos do sistema imune que podem refletir em reações farmacológicas adversas (BRUNNER; JENSEN-JAROLIN; PALI-SCHÖLL, 2010).

Os adjuvantes mais comuns são o hidróxido de alumínio, fosfato de alumínio e fosfato de cálcio, além de emulsões de óleos, produtos bacterianos e seus derivados sintéticos, como lipossomos. Atualmente adjuvantes como MPL (lipídio monofosforil A), ISCOMs associados a Quil-A e SAF (Syntex adjuvant formulation) contendo treonil derivado do dipeptídeo muramil tem sido utilizados em vacinas. A escolha de um composto adjuvante irá depender de um equilíbrio entre a sua imunogenicidade e baixos, ou aceitáveis, efeitos colaterais (GUPTA et al., 1993).

A escolha do adjuvante depende de algumas considerações, como conhecimento da patogênese da doença e da proteção correlata, metas da vacina, antígenos envolvidos, população envolvida, e o conhecimento do modo de ação do adjuvante. Intensificar os esforços para compreender o modo de ação dos adjuvantes é uma parte fundamental do processo (MASTELIC et al., 2010).

Conclusão

O uso de anticoccidianos na ração de frangos ao longo dos anos permitiu a seleção de cepas resistentes de *Eimeria spp.* Tal quadro desestimulou a produção de novos medicamentos pelos laboratórios. A possibilidade de resíduos na carne e a exigência do mercado consumidor foram outros fatores determinantes. Com isso a Comissão da União Européia determinou a retirada gradativa desses agentes da ração de frangos até dezembro de 2012. Diante de tal fato, houve o estímulo de pesquisas por uma forma alternativa de controle, no caso as vacinas.

Já existem alguns tipos de vacinas no mercado, principalmente as vivas virulentas e atenuadas. Essas vacinas, apesar de serem eficientes na promoção de imunidade protetora, ainda possuem desvantagens (como o custo elevado e possibilidade de causar doença) que não permitiram a total aceitação por parte dos produtores.

Diante de tal fato as vacinas recombinantes parecem ser, atualmente, a alternativa mais promissora no controle da coccidiose. Entretanto, para que estas vacinas sejam efetivas, alguns fatores devem ser levados em consideração, como as escolhas das proteínas, adjuvantes e vias de administração corretas. Apesar de existirem diversas pesquisas com este tipo de vacina, só existe uma vacina comercializada atualmente (CoxAbic®).

Finalmente, é importante ressaltar que o controle da coccidiose aviária é extremamente complexo, e que, novos estudos devem ser estimulados para o desenvolvimento de métodos eficazes para a produção de carne de frango livre de medicamentos.

Referências

- BELLI, A. I.; MAI, K.; SKENE, C. D.; GLEESON, M. T.; WITCOMBE, D. M.; KATRIB, M.; FINGER, A.; WALLACH, M. G.; SMITH, N. C. Characterization of the antigenic and immunogenic properties of bacterially expressed, sexual stage antigens of the coccidian parasite, *Eimeria maxima*. *Vaccine*, Kidlington, v. 22, n. 31-32, p. 4316-4325, 2004.
- BRUNNER, R.; JENSEN-JAROLIN, E.; PALI-SCHÖLL, I. The ABC of clinical and experimental adjuvants - a brief overview. *Immunology Letters*, v. 128, n. 1, p. 29-35, 2010.
- CACHO, E.; GALLEGO, M.; PAGES, M.; MONTEAGUDO, L.; SÁNCHEZ-ACEDO, C. HSP70 is a part of the synaptonemal complex in *Eimeria tenella*. *Parasitology International*, v. 57, p. 454-459, 2008.
- CACHO, E.; GALLEGO, M.; LÓPEZ-BERNARD, F.; QUÍLEZ, J.; SÁNCHEZ-ACEDO, C. Expression of anti-apoptotic factors in cells parasitized by second-generation schizonts of *Eimeria tenella* and *Eimeria necatrix*. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 45, n. 3-4, p. 287-300, 2004.
- CARDOZO, S. P.; YAMAMURA, M. H. Identificação de espécies de *Eimeria sp.* E avaliação de escore de lesões intestinais entre frangos vacinados e tratados com anticoccidianos, produzidos no sistema colonial/caipira. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 27, n. 2, p. 261-270, abr./jun. 2006.
- CHAPMAN, H. D. Situação atual da coccidiose nos EUA. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COCCIDIOSE, n. 7, 1994, Santos. *Anais... Santos: FACTA*, p. 55-62, 1994.
- _____. Biochemical, genetic and applied aspects of drug resistance in *Eimeria* parasites of the fowl. *Avian Pathology*, v. 26, n. 2, p. 221-224, 1997.
- CONSTANTINOIU, C. C.; MOLLOY, J. B.; JORGENSEN, W. K.; COLEMAN, G. T. Characterization of the antibody responses in birds following infection with wild-type and attenuated strains of *Eimeria tenella* and *Eimeria necatrix*. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 175, n. 1-2, p. 47-51, 2011.
- COOMBS, G. H.; MÜLLER, S. Recent advances in the search for new anti-coccidial drugs. *International Journal for Parasitology*, Elmsford, v. 32, n. 5, p. 497-508, 2002.
- DALTON, J. P.; MULCAHY, G. Parasites vaccines – a reality? *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 98, n. 1-3, p. 149-167, 2001.
- DALLOUL, R. A.; LILLEHOJ, H. S.; KLINMAN, D. M.; DING, X. MIN, W.; HECKERT, R. A.; LILLEHOJ, E. P. In ovo administration of CpG oligodeoxynucleotides and the recombinant microneme protein MIC2 protects against *Eimeria* infections. *Vaccine*, 23, p. 3108-3113, 2005.

DANFORTH, H. D.; AUGUSTINE, P. C.; RUFF, M. D.; MCCANDLISS, R.; STRAUSBERG, R. L.; LIKEL, M. Genetically engineered antigen confers partial protection against avian coccidial parasites. *Poultry Science*, Honduras, v. 68, n. 12, p. 1643-52, 1989.

DASZAK, P. Zoite migration during infection: parasite adaptation to host defences. *Parasitology Today*, Califórnia, v. 15, n. 2, p. 67-72, 1999.

DU, A.; HU, S.; WANG, S. *Eimeria tenella*: Ginsenosides-enhanced immune response to the immunization with recombinant 5401 antigen in chickens. *Experimental Parasitology*, v. 111, n. 3, p. 191-197, 2005.

FERNÁNDEZ-ROBLEDO, J. A.; VASTA, G. R. Production of recombinant proteins from protozoan parasites. *Trends in Parasitology*, v. 26, n. 5, p. 244-254, 2010.

GARCIA, J. L.; GUIMARÃES JUNIOR, J. S.; BOGADO, A. L. G.; BUNGNI, F. M.; RAMALHO, D. C.; SOUZA, L. M. *Eimeria tenella*: utilization of a nasal vaccine with sporozoite antigens incorporated into iscom as protection for broilers breeders against a homologous challenge. *Experimental Parasitology*, v. 120, n. 2, p. 185-190, 2008.

GERILETU, XU, L.; XURIHUA, LI, X. Vaccination of chickens with DNA vaccine expressing *Eimeria tenella* MZ5-7 against coccidiosis. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 177, n. 1-2, p. 6-12, 2011.

GLENNY, E. T.; POPE, C. G.; WADDINGTON, H.; WALLACE, U. Immunological notes XVII to XXIV. *J Pathol*, v. 29, n. 1, p. 31-40, 1926.

GUIMARÃES JÚNIOR, J. S.; GUIMARÃES, I. G.; PEREIRA, A. B. L.; ROCHA, M. A.; CARDOSO, M. A.; OIDE, M. M.; TANAKA, A. A.; RORATO, A. A. Ocorrência de *Eimeria spp* em galinhas reprodutoras no norte do Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 12, n. 1, p. 44-48, 1991.

GUPTA, R. K.; RELYVELD, E. H.; LINDBLAD, E. B.; BIZZINI, B.; BEN-EFRAIN, S.; GUPTA, C. K. Adjuvants - a balance between toxicity and adjuvanticy. *Vaccine*, Kidlington, v. 11, n. 3, p. 293-306, 1993.

JENKINS, M. C. Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 101, n. 3-4, p. 291-310, 2001.

_____. Progress on developing a recombinant coccidiosis vaccine. *International Journal for Parasitology*, Elmsford, v. 28, n. 7, p. 1111-1119, 1998.

JENKINS, M. C.; LILLEHOJ, H. S.; DAME, J. B. *Eimeria acervulina*: DNA cloning and characterization of recombinant sporozoite and merozoite antigens. *Experimental Parasitology*, v. 66, n. 1, p. 96-107, 1988.

JENKINS, M. C.; LILLHOJ, H. S.; BARTA, J. R.; DANFORTH, H. D.; STROHLICIN, D. A. *Eimeria acervulina*: cloning a cDNA encoding an immunogenic region of several related merozoite surface and rhoptry neck proteins. *Experimental Parasitology*, v. 70,

n. 3, p. 353-362, 1990.

KINNAIRD, J. H.; BUMSTEAD, A. M.; MANN, D. J.; RYAN, R.; SHIRLEY, M. W.; SHIELS, B. R.; TOMLEY, F. M. EtCRK2, a cyclin-dependent kinase gene expressed during the sexual and asexual phases of the *Eimeria tenella* life cycle. *International Journal for Parasitology*, Elmsford, v. 34, n. 6, p. 683-692, 2004.

KLOTZ, C. Identification of *Eimeria tenella* genes encoding for secretory proteins and evaluation of candidates by DNA immunization studies in chickens. *Vaccine*, Kidlington, v. 25, n. 36, p. 6625-6634, 2007.

KLOTZ, C.; MARHÖFER, R. J.; SELZER, P. M.; LUCIUS, R.; POGONKA, T. *Eimeria tenella*: Identification of secretory and surface proteins from expressed sequence tags. *Experimental Parasitology*, v. 111, n. 1, p. 14-23, 2005.

LAMPHEAR, B. J.; STREATFIELD, S. J.; JILKA, J. M.; BROOKS, C. A.; BARKER, D. K.; TURNER, D. D.; DELANEY, D. E.; GARCIA, M.; WIGGINS, B.; WOODARD, S. L.; HOOD, E. E.; TIZARD, I. R.; LAWHORN, B.; HOWARD, J. A. Delivery of subunit vaccines in maize seed. *Journal of Controlled Release*, v. 85, n. 1-3, p. 169-180, 2002.

LI, G. Q.; KANU, S.; XIANG, F. Y.; XIAO, L. Z.; CHEN, H. W.; YE, H. J. Isolation and selection of ionophore-tolerant *Eimeria* precocious lines: *E. tenella*, *E. maxima* and *E. acervulina*. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 119, n. 4, p. 261-276, 2004.

LI, X.; SHAH, M. A. A.; YAN, R.; XU, L.; SONG, X. A recombinant DNA vaccine encoding *Eimeria acervulina* cSZ-2 induces immunity against experimental *E. tenella* infection. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 169, n. 1-2, p. 185-189, 2010.

LILLEHOJ, E. P.; YUN, C. H.; LILLEHOJ, H. S. Vaccines against the avian enteropathogens *Eimeria*, *Cryptosporidium* and *Salmonella*. *Animal Health Research Reviews*, v. 1, n. 1, p. 47-65, 2000a.

LILLEHOJ, H. S.; CHOI, K. D.; JENKINS, M. C.; VAKHARIA, V. N.; SONG, K. D.; HAN, J. Y.; LILLEHOJ, E. P. A recombinant *Eimeria* protein inducing interferon- γ production: comparison of different gene expression systems and immunization strategies for vaccination against coccidiosis. *Avian Diseases*, v. 44, n. 2, p. 379-389, 2000b.

LUCHESE, F. C.; PERIN, M.; AITA, R. S.; MOTTIN, V. D.; MOLENTO, M. B.; MONTEIRO, S. G. Prevalência de espécies de *Eimeria* em frangos de criação industrial e alternativa. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 81-86, 2007.

MA, D.; MA, C.; PAN, L.; LI, G.; YANG, J.; HONG, J.; CAI, H.; REN, X. Vaccination of chickens with DNA vaccine encoding *Eimeria acervulina* 3-1E and chicken IL-15 offers protection against homologous challenge. *Experimental Parasitology*, v. 127, n. 1, p. 208-214, 2011.

MASTELIC, B.; AHMED, S.; EGAN, W. M.; GIUDICE, G.; GOLDING, H.; GUST, I.; NEELS, P.; REED, S. G.; SHEETS, R. L.; SIEGRIST, C.; LAMBERT, P. Mode of action of adjuvants: implications for vaccine safety and design. *Biologicals*, v. 38, n. 5, p. 594-

601, 2010.

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

MIN, W.; LILLEHOJ, H. S.; BURNSIDE, J.; WEINING, K. C.; STAEHELI, P.; ZHU, J. J. Adjuvant effects of *IL-1 β* , *IL-2*, *IL-8*, *IL-15*, *IFN- α* , *IFN- γ* , *TGF- β 4* and *lymphotactin* on DNA vaccination against *Eimeria acervulina*. *Vaccine*, Kidlington, v. 20, n. 1-2, p. 267-274, 2002.

PÉROVAL, M.; PERY, P.; LABBE, M. The heat shock protein 90 of *Eimeria tenella* is essential for invasion of host cell and schizont growth. *International Journal for Parasitology*, Elmsford, v. 36, n. 10-11, p. 1205-1215, 2006.

POGONKA, T.; KLOTZ, C.; KOVACS, F.; LUCIUS, R. A single dose of recombinant *Salmonella typhimurium* induces specific humoral immune responses against heterologous *Eimeria tenella* antigens in chickens. *International Journal for Parasitology*, Elmsford, v. 33, n. 1, p. 81-88, 2003.

PROELLOCKS, N. I.; COPPEL, R. L.; WALLER, K. L. Dissecting the apicomplexan rhoptry neck proteins. *Trends in Parasitology*, v. 26, n. 6, p. 297-304, 2010.

SHAH, M. A. A.; YAN, R.; XU, L.; SONG, X. LI, X. A recombinant DNA vaccine encoding *Eimeria acervulina* cSZ-2 induces immunity against experimental *E. tenella* infection. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v.169, n. 1-2, p. 185-189, 2010.

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

SONG, X.; XU, L.; YAN, R.; HUANG, X.; SHAH, M. A. A.; LI, X. The optimal immunization procedure of DNA vaccine pcDNA-TA4-IL-2 of *Eimeria tenella* and its cross-immunity to *Eimeria necatrix* and *Eimeria acervulina*. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 159, n. 1, p. 30-36, 2009.

SUBRAMANIAN, B. M.; SRIRAMAN, R.; HANUMANTHA RAO, N.; RAGHUL, J.; THIAGARAJAN, D.; SRINIVASAN. Cloning, expression and evaluation of the efficacy of a recombinant *Eimeria tenella* sporozoite antigen in birds. *Vaccine*, 26, p. 3483-3496, 2008.

TIZARD, I. R. The avian antibody response. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, v. 11, n. 1, p. 2-14, 2002.

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

TROUT, J. M.; LILLEHOJ, H. S. T. Lymphocyte roles during *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 53, n. 1-2, p. 163-172, 1996.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA - UBABEF. *Avicultura brasileira em 2010: exportações e produção*. 2010. Disponível em: <http://www.abef.com.br/noticias_portal/down.php?arg=RXN0YXRpc3RpY2FzX1ViYWJlZl8yMDEwX0ZpbmFsLmRvYw==>. Acesso em: 09 jan. 2012.

UNIÃO EUROPÉIA. *Parlamento Europeu e Conselho*. Regulamento (CE) n. 1831, de 22 de Setembro de 2003. Relativo aos aditivos destinados à alimentação animal. Lex: Jornal Oficial da União Européia, [Documento on line]. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/pt/oj/2003/l_268/l_26820031018pt00290043.pdf>. Acesso em: 19 abr. 2007.

VENEVELLES, P.; CHIC, J. F.; FAIGLE, W.; LOMBARD, B.; LOEW, D.; PÉRY, P.; LABBÉ, M. Study of proteins associated with the *Eimeria tenella* refractile body by a proteomic approach. *International Journal of Parasitology*, v. 36, n. 13, p. 1399-1407, 2006.

VERMEULEN, A. N.; SCHAAP, D. C.; SCHETTERS, T. H. P. M. Control of coccidiosis in chickens by vaccination. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 100, n. 1-2, p. 13-20, 2001.

WILLIAMS, R. B. A compartmentalized model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. *International Journal for Parasitology*, Elmsford, v. 29, n. 8, p. 1209-1229, 1999.

XU, Q.; SONG, X.; XU, L.; YAN, R.; SHAH, M. A. A.; LI, X. Vaccination of chickens with a chimeric DNA vaccine encoding *Eimeria tenella* TA4 and chicken IL-2 induces protective immunity against coccidiosis. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 156, n. 3-4, p. 319-323, 2008.

YANG, G.; WANG, C.; HAO, F.; ZHANG, Y.; LI, Y. Studies on construction of a recombinant *Eimeria tenella* SO7 gene expressing *Escherichia coli* and its protective efficacy against homologous infection. *Parasitology international*, v. 59, n. 4, p. 517-523, 2010.

YANG, L.; ZHU, W.; WANG, X. Z.; LONG, Q. X.; XIE, M. Q.; HUANG, X. Q. Cloning of Etp28 gene of *Eimeria tenella* (Guangdong strain) sporozoites and its expression in *baculovirus* expression system. Sheng wu hua xue yu sheng wu wu li xue bao Acta biochimica et biofysica Sinica. *Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica*, v. 30, n. 3, p. 293-298, 1998.

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

ZULPO, D.; PERETTI, J.; ONO, L. M.; LONGHI, E.; OLIVEIRA, M. R.; GUIMARÃES, I. G.; HEADLEY, S. A.; GUIMARÃES JUNIOR, J. da S.; GARCIA, J. L. Patogenicidade e observações histopatológicas de frangos de corte infectados experimentalmente com isolados de *Eimeria tenella*, *E. acervulina* e *E. máxima*. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 28, n. 1, p. 97-104, jan./mar. 2007.