

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

TESE

**Análise da resposta inflamatória e do microbioma cecal de frangos de corte
desafiados com diferentes doses vacinais contra *Eimeria* spp.**

Pamella Pryscila de Alvarenga Bissoli Maciel de Lima

2026



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

ANÁLISE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E DO MICROBIOMA CECAL DE
FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM DIFERENTES DOSES VACINAIS
CONTRA *Eimeria* SPP.

PAMELLA PRYSCILA DE ALVARENGA BISSOLI MACIEL DE LIMA

Sob a Orientação do Professor

Prof.º Dr. Huarrisson Azevedo Santos

Coorientação dos Professores

Prof.º Dr. Felipe Dilelis de Resende Souza

Prof.º Dr. Leandro dos Santos Machado

Tese submetida como
requisito parcial para a
obtenção do grau de
Doutora em Ciências no
Programa de Pós-graduação
em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2026

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L732 a Lima, Pamella Pryscila de Alvarenga Bissoli Maciel ,
1989-
Análise da resposta inflamatória e do microbioma
cecal de frangos de corte desafiados com diferentes
doses vacinais contra Eimeria spp. / Pamella Pryscila
de Alvarenga Bissoli Maciel Lima. - Pindamonhangab,
2026.
93 f.

Orientador: Huarisson de Azevedo Santos.
Coorientador: Felipe Dilelis .
Coorientador: Leandro Santos Machado.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Ciências
Veterinárias, 2026.

1. Gallus gallus. 2. Eimeria tenella. 3. Eimeria
acervulina. 4. Expressão gênica. 5. NGS. I. Santos,
Huarisson de Azevedo, 1980-, orient. II. Dilelis ,
Felipe , 1988-, coorient. III. Machado, Leandro
Santos, 1980-, coorient. IV Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em
Ciências Veterinárias. V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA N° 1016/2026 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

N° do Protocolo: 23083.014548/2026-15

Seropédica-RJ, 30 de março de 2026.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

PAMELLA PRYSCILA DE ALVARENGA BISSOLI MACIEL DE LIMA

**ANÁLISE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA E DO MICROBIOMA CECAL DE FRANGOS DE CORTE
DESAFIADOS COM DIFERENTES DOSES VACINAIS CONTRA *Eimeria* spp.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor(a) em Ciências Veterinárias.

Tese aprovada em 27 de fevereiro de 2026.

BANCA EXAMINADORA:

(Assinado digitalmente em 06/04/2026 16:00)

ALICIA ZEM FRAGA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DPA (12.28.01.00.00.00.63)
Matricula: ###008#7

(Assinado digitalmente em 06/04/2026 15:26)

HUARRISSON AZEVEDO SANTOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matricula: ###014#2

(Assinado digitalmente em 06/04/2026 14:17)

TULIO LEITE REIS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptNAP (12.28.01.00.00.00.62)
Matricula: ###217#3

(Assinado digitalmente em 27/04/2026 09:54)

DAYSE LIMA DA COSTA ABREU
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.837-##

(Assinado digitalmente em 09/04/2026 22:29)

NELSON RODRIGO DA SILVA MARTINS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.470-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **1016**, ano: **2026**, tipo: **ATA**, data de emissão: **30/03/2026** e o código de verificação: **a62b7b4f09**

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, a Deus e à Nossa Senhora de Aparecida por me concederem força ao longo de toda a minha trajetória. Agradeço ao Pai Benedito, Pai Nhonho, Caboclo Sete Flechas, Caboclo Pena Dourada e a todos os guias que me fortaleceram, me concedendo coragem e resiliência em todos os momentos de dificuldade. Agradeço à minha mãe por estar sempre ao meu lado, oferecendo apoio e suporte em todas as minhas decisões, desde a troca de curso e de universidade até a escolha e a paixão pela pesquisa, sendo fundamental em cada etapa do meu caminho.

Agradeço ao Samuel pelo apoio, compreensão e paciência diante da minha carga excessiva de trabalho, das saídas muito cedo, das chegadas tarde em casa e, muitas vezes, do trabalho aos finais de semana. Aos meus amigos Aline, Naya, Camilinha, Gordinho, Allan, Nancy e Ju por compreenderem a minha ausência em diversos momentos, inclusive em ocasiões importantes, em razão da distância de casa e da dedicação à minha trajetória acadêmica.

Agradeço ao professor Huarrisson pela oportunidade de realizar um sonho: o doutorado. Pela confiança em meu trabalho, me permitindo realizar todos os experimentos que delineei durante esse período, não apenas aqueles vinculados diretamente à minha tese. À professora Patrícia Paulino, Paty, por tudo o que me ensinou desde 2018, desde a primeira vez em que cheguei ao laboratório. Obrigada por ter sido uma pessoa essencial em toda a minha formação.

Agradeço aos professores Felipe e Túlio pela oportunidade de realizar um experimento a campo, bem como pelo incentivo e pelas parcerias ao longo desse período. Ao professor Leandro, por todo ensinamento compartilhado. Ao professor Jean, pela confiança, apoio e parceria. Sem vocês, eu não conseguiria concluir este doutorado de forma tão realizada.

Agradeço ao Laboratório de Sanidade Avícola, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, ao Instituto de Veterinária e a todos os professores e funcionários que contribuíram para a minha formação acadêmica.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO GERAL

Lima, Pamella Pryscila de Alvarenga Bissoli Maciel de Lima. **Análise da resposta inflamatória e do microbioma cecal de frangos de corte desafiados com diferentes doses vacinais contra *Eimeria* spp.** 93 p. Tese (Doutor em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2026.

A coccidiose aviária é uma doença entérica causada por *Eimeria* spp., responsável por comprometer a integridade do epitélio intestinal, reduzir a absorção de nutrientes e prejudicar o desempenho zootécnico das aves. Entre as espécies de maior importância para a avicultura destacam-se *Eimeria tenella*, *E. acervulina* e *E. maxima*. Neste estudo, frangos de corte Cobb 500 foram desafiados por gavagem oral, no primeiro dia de vida, com a vacina Fortegra® (MSD Saúde Animal), contendo oocistos atenuados dessas três espécies, em doses correspondentes a 10x, 20x e 40x a dose recomendada pelo fabricante, além de um grupo controle tratado com PBS. Amostras de tecidos intestinais e conteúdo cecal foram coletadas aos 7, 14 e 21 dias pós-desafio. A presença de *Eimeria* spp. nos tecidos intestinais foi avaliada por qPCR, e a expressão de genes relacionados à resposta imune e à integridade intestinal, bem como a composição da microbiota cecal, foram analisadas por abordagens moleculares. Os resultados demonstraram que tanto a dose do desafio quanto o tempo pós-infecção influenciaram a resposta imune, a integridade intestinal e a microbiota cecal dos frangos. No experimento de expressão gênica, utilizando os grupos 10x e 40x, a maior carga parasitária induziu respostas imunes mais intensas e prolongadas, caracterizadas pela modulação de citocinas pró- e anti-inflamatórias e pela regulação de genes relacionados às junções de adesão do epitélio intestinal. Observou-se um padrão temporal com picos iniciais de mediadores pró-inflamatórios, seguidos pela ativação de mecanismos moduladores, sugerindo tentativa do hospedeiro de conter a inflamação e restabelecer a homeostase intestinal. Entretanto, a maior carga parasitária também indicou possível supressão progressiva da resposta imune, o que pode comprometer a eliminação do patógeno e prolongar o reparo tecidual. Em paralelo, no experimento de microbiota, com os grupos 10x e 20x, a comunidade cecal foi modulada principalmente pelo tempo pós-infecção, com aumento progressivo da riqueza, equitabilidade e diversidade até 21 dias, refletindo o processo de maturação intestinal. O efeito da dose sobre o microbioma foi mais limitado, sendo a menor dose associada a maior equilíbrio microbiano e menor presença de táxons oportunistas, enquanto a dose mais elevada esteve relacionada à redução de gêneros potencialmente benéficos e ao aumento de táxons potencialmente patogênicos. De forma geral, os achados demonstram que a interação entre dose infecciosa e tempo pós-infecção é determinante para a compreensão dos mecanismos imunológicos e das alterações microbianas associadas à coccidiose em frangos, contribuindo para o aprimoramento de estratégias de controle, manejo e prevenção da doença na avicultura.

Palavras-chave: *Gallus gallus*, *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina*, *Eimeria máxima*, Expressão gênica, NGS, 16S rRNA.

GENERAL ABSTRACT

LIMA, Pamella Priscila de Alvarenga Bissoli Maciel de Lima. **Analysis of the inflammatory response and cecal microbiome of broiler chickens challenged with different vaccine doses against *Eimeria* spp.** 93 p. Thesis (Doctorate in Veterinary Sciences). Institute of Veterinary Medicine, Department of Epidemiology and Public Health, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2026.

Avian coccidiosis is an enteric disease caused by *Eimeria* spp. that impairs the integrity of the intestinal epithelium, reduces nutrient absorption, and compromises the zootechnical performance of birds. Among the species of greatest importance to poultry production are *Eimeria tenella*, *E. acervulina*, and *E. maxima*. In this study, Cobb 500 broiler chickens were orally challenged on the first day of life with Fortegra® vaccine (MSD Animal Health), containing attenuated oocysts of these three species, at doses corresponding to 10×, 20×, and 40× the manufacturer's recommended dose, in addition to a control group receiving PBS. Intestinal tissue and cecal content samples were collected at 7, 14, and 21 days post-challenge. The presence of *Eimeria* spp. in intestinal tissues was evaluated by qPCR, and the expression of genes related to immune response and intestinal integrity, as well as the composition of the cecal microbiota, were analyzed using molecular approaches. The results showed that both challenge dose and post-infection time influenced the immune response, intestinal integrity, and cecal microbiota of broilers. In the gene expression experiment, using the 10× and 40× groups, the higher parasite load induced more intense and prolonged immune responses, characterized by modulation of pro- and anti-inflammatory cytokines and regulation of genes related to adhesion junctions in the intestinal epithelium. A temporal pattern was observed, with early peaks of pro-inflammatory mediators followed by the activation of modulatory mechanisms, suggesting an attempt by the host to contain inflammation and restore intestinal homeostasis. However, the higher parasite load also indicated a possible progressive suppression of the immune response, which may compromise pathogen clearance and prolong tissue repair. In parallel, in the microbiota experiment, using the 10× and 20× groups, the cecal community was modulated mainly by post-infection time, with a progressive increase in richness, evenness, and diversity up to 21 days, reflecting the process of intestinal maturation. The effect of dose on the microbiome was more limited, with the lower dose being associated with greater microbial balance and lower representation of opportunistic taxa, whereas the higher dose was associated with a reduction in potentially beneficial genera and an increase in potentially pathogenic taxa. Overall, these findings demonstrate that the interaction between infectious dose and post-infection time is critical for understanding the immunological mechanisms and microbial alterations associated with coccidiosis in broiler chickens, contributing to the improvement of control, management, and prevention strategies in poultry production.

Key words: *Gallus gallus*, *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, Gene expression, NGS, 16S rRNA.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	5
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Avicultura	2
2.2 Coccidiose	2
2.3 Ciclo Biológico <i>Eimeria</i> spp.....	2
2.3.1 Espécies de <i>Eimeria</i> spp	4
2.3.2 Diagnóstico	5
2.3.4 Prevenção, tratamento e controle	6
2.4 Barreira Intestinal e Resposta Imune do Intestino	8
2.5 Microbioma	11
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
CAPÍTULO I: DOSE AND AGE-DEPENDENT EFFECTS OF EIMERIA SPP. INFECTION ON CYTOKINE AND INTESTINAL INTEGRITY GENE EXPRESSION IN BROILER CHICKENS.....	20
4. INTRODUÇÃO.....	23
5. MATERIAL E MÉTODOS	25
5.1 Coleta de amostras e desafio de vacinal.....	25
5.2 Extração de DNA e RNA	26
5.3 Ensaio molecular e curva padrão.....	26
5.4 Síntese de cDNA e análise de expressão gênica.....	27
5.5 Análise estatística	28

6. RESULTADOS.....	29
6.1 Detecção de <i>Eimeria</i> spp. no ceco de frangos	29
6.2 Expressão dos genes de saúde intestinal em função da dose de desafio	29
.....	30
6.3 Expressão dos genes de saúde intestinal em função da idade	31
6.4 Expressão gênica de citocinas em função da dose de desafio	32
6.5 Expressão gênica de citocinas em função da idade	36
7. DISCUSSÃO	38
8. CONCLUSÃO.....	42
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
CAPÍTULO II: EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE EIMERIA SPP. SOBRE A COMPOSIÇÃO E DIVERSIDADE TAXONÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE FRANGOS AO LONGO DO TEMPO PÓS-INFEÇÃO.....	48
10. INTRODUÇÃO	52
11. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
11.1. Coleta de material e desafio vacinal	53
11.2. Coleta das amostras e extração de DNA	55
11.3. Construção da Biblioteca	56
11.4. Bioinformática	56
11.5. Estatística	57
12.RESULTADO.....	57
12.1 Sequências 16S.....	57

12.2. Composição taxonômica	57
12.3.Diversidade microbiana	69
12.3.1 Alfa-diversidade.....	69
12.3.2 Beta-diversidade	72
13. DISCUSSÃO	76
14.CONCLUSÃO	81
15. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	81
16. CONCLUSÃO GERAL.....	86
17. ANEXOS	88
17.1 Etapa de purificação dos amplicons	88
17.2 Etapa de purificação do Index	88

1. INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento da população mundial tem impulsionado a demanda por alimentos de origem animal, especialmente carne e ovos de aves, gerando perspectivas de expansão contínua para o setor avícola nas próximas décadas. O Brasil se destaca nesse cenário como um dos líderes globais, sendo o maior exportador de carne de frango e o terceiro maior produtor mundial, atrás apenas dos Estados Unidos e da China. Em 2024, a produção nacional atingiu cerca de 15 milhões de toneladas de carne de frango, das quais 5 milhões foram destinadas à exportação, e o país figura ainda como o quinto maior produtor de ovos (ABPA, 2025). Essa expressiva participação no mercado internacional reflete o investimento contínuo em genética, nutrição, manejo, biossegurança e sanidade avícola.

Em função dos avanços tecnológicos, a intensificação produtiva e a seleção genética voltada majoritariamente para características zootécnicas, como ganho de peso e conversão alimentar, houve uma menor ênfase na resistência a doenças. Esse contexto aumenta a suscetibilidade das aves a enfermidades que comprometem o desempenho produtivo e a viabilidade econômica da atividade.

Dentre essas enfermidades, a coccidiose aviária, causada por protozoários do gênero *Eimeria*, destaca-se como um dos principais desafios sanitários da avicultura mundial, gerando perdas superiores a US\$ 3 bilhões anuais (Blake; Tomley, 2014). A coccidiose compromete a integridade intestinal, a absorção de nutrientes, e consequentemente, o desempenho zootécnico das aves. Pode, ocorrer de forma clínica ou subclínica, sendo esta última de grande impacto econômico devido à redução no ganho de peso e piora na conversão alimentar.

O controle da doença baseia-se no uso de anticoccidianos e na vacinação, sendo esta última considerada uma alternativa estratégica para reduzir a pressão de resistência a medicamentos e promover imunidade protetora contra diferentes espécies de *Eimeria*. Entretanto, a resposta imune e a saúde intestinal das aves após a vacinação podem variar de acordo com fatores como manejo, dose vacinal e pressão de infecção ambiental.

Além do impacto direto da *Eimeria* spp. na mucosa intestinal, a infecção provoca alterações na microbiota e na resposta imune, com repercussões sobre a barreira epitelial e a homeostase do trato gastrointestinal. Marcadores moleculares como proteínas de junção estreita (claudinas, ocludinas, JAMs, ZO) e citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-2, IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-10, TGF- β) desempenham papéis centrais nesse processo, refletindo o estado de integridade intestinal e o equilíbrio entre respostas inflamatórias e regulatórias.

Nesse contexto, compreender como diferentes doses vacinais de *Eimeria* spp.₁

modulam a resposta inflamatória e a composição da microbiota intestinal é fundamental para aprimorar protocolos de imunização e manejo sanitário. A análise integrada de parâmetros histopatológicos, expressão gênica de citocinas e proteínas de junção, bem como da dinâmica microbiana, pode fornecer informações relevantes para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes no controle da coccidiose, garantindo produtividade e bem-estar animal.

Assim, o presente estudo foi estruturado em capítulos, com o objetivo de avaliar as respostas inflamatórias do ceco e as alterações no microbioma do ceco de frangos desafiados com diferentes doses vacinais de *Eimeria* spp. As hipóteses centrais são de que doses elevadas da vacina podem modificar de forma significativa a expressão de genes relacionados à saúde intestinal e à resposta imune, bem como alterar a composição da microbiota, influenciando a resistência das aves e o equilíbrio funcional do trato gastrointestinal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Panorama da avicultura brasileira

A avicultura representa um dos setores mais relevantes do agronegócio brasileiro. De acordo com o Relatório Anual de 2025 da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2025), em 2024, o Brasil produziu cerca de 15 milhões de toneladas de carne de frango, das quais 5 milhões foram destinadas à exportação. O país é o maior exportador de carne de frango e é o terceiro maior produtor global, atrás apenas dos Estados Unidos e da China.

Além da carne de frango, o Brasil destaca-se como o quinto maior produtor mundial de ovos (ABPA, 2025). Os estudos com material genético avícola, voltados para a seleção e melhoria de linhagens, têm ampliado sua atuação, exportando conteúdo para sessenta e nove países (ABPA, 2025), fortalecendo mais ainda a avicultura brasileira no cenário internacional. A crescente demanda por produtos avícolas e o alto consumo do mercado têm gerado forte pressão sobre todos os setores da cadeia produtiva de aves, exigindo melhorias constantes na taxa de crescimento, na eficiência alimentar e no status sanitário (BASSI; SILVA, 2017).

Nesse contexto, a criação intensiva se consolidou como o principal modelo de produção de frangos no Brasil, baseada em avanços genéticos, nutricionais e tecnológicos, além de melhorias na formulação de vacinas, nas instalações e nos equipamentos, o que contribuiu significativamente para o aumento da produtividade (SAKAMOTO et al., 2020). Os avanços tecnológicos na produção, e na seleção genética dos frangos de corte tem priorizado características econômicas, como a taxa de crescimento e a eficiência alimentar,

deixando em segundo plano a resistência a doenças (LESHCHINSKY; KLASING, 2001).

Essa falta de seleção específica pode ter favorecido a emergência de características desfavoráveis, como a redução da resistência imunológica geral, aumentando a suscetibilidade dos animais a infecções. Portanto, é essencial desenvolver linhagens com melhor resistência a doenças infecciosas e maior capacidade de adaptação, garantindo, assim, tanto o bem-estar animal quanto a sustentabilidade econômica da produção avícola (SWINKELS et al., 2007).

Dentre as principais doenças que afetam a avicultura, destaca-se a coccidiose, sendo um dos maiores desafios associados à doença sua forma subclínica, que compromete o desempenho zootécnico das aves sem manifestar sinais clínicos evidentes, resultando em prejuízos econômicos expressivos para a produção (REMMAL et al., 2011). O controle e o tratamento eficazes da coccidiose são essenciais para garantir o alto desempenho produtivo da avicultura brasileira e prevenir prejuízos econômicos que comprometam o setor.

2.2 Coccidiose aviária

A coccidiose aviária é uma doença entérica que prejudica o crescimento de frangos e galinhas, e suprime o sistema imunológico, podendo resultar em alta mortalidade, e um gasto já estimado de US\$ 3 bilhões na indústria avícola (BLAKE; TOMLEY, 2014). É uma doença causada por protozoários intracelulares do filo Apicomplexa, pertencentes ao gênero *Eimeria*, acometendo aves domésticas, tanto industriais como as de subsistência. A infecção ocorre pela ingestão de oocistos esporulados presentes no ambiente, frequentemente misturados à cama, alimento ou água (ALLEN; FETTERER, 2002).

O oocisto esporulado pode sobreviver fora do hospedeiro por até 60 dias, enquanto o não esporulado pode persistir por até 7 meses no tecido cecal, devido à sua parede dupla composta por proteínas e lipídios, lhe conferindo alta resistência. As proteínas garantem grande estabilidade estrutural contra calor ou frio extremos, desde que esses parasitos são sensíveis a altas temperaturas e à dessecação. É provável que a camada externa proteja sua estrutura de danos mecânicos, enquanto a camada interna, rica em lipídios, o protege de ataques químicos (FATOBA; ADELEKE, 2018; QUIROZ-CASTAÑEDA; DANTÁN-GONZÁLEZ, 2015).

2.3 Ciclo Biológico de *Eimeria* spp.

O ciclo biológico de *Eimeria* spp. tem uma duração média de 4 a 7 dias, dependendo da espécie considerada, sendo dividido em três fases principais: esquizogonia (assexuada), gametogonia (sexuada) e esporogonia (BURRELL et al., 2020).

O oocisto, após ser ingerido, sofre ação mecânica da moela e ação enzimática no trato digestivo, alterando a estrutura e a permeabilidade de sua parede, promovendo a liberação dos esporocistos. Os esporozoítos contidos em cada esporocisto removem o tampão de proteínas e carboidratos, chamado de corpo de *Stieda*, localizado na extremidade pontiaguda e estreita do esporocisto, permitindo assim que os esporozoítos saiam da cavidade do oocisto (ALLEN; FETTERER, 2002; KAWAZOE, 2000). Esse processo denominado excitação libera os esporozoítos no lúmen do intestino (MESA-PINEDA et al., 2021).

Os esporozoítos invadem os enterócitos, e se diferenciam em trofozoítos, iniciando a esquizogonia. Nesse processo, formam-se esquizontes (merontes) repletos de merozoítos (MESA-PINEDA et al., 2021). A cada ciclo assexuado ocorre lise celular, seguida da liberação dos merozoítos. Esse mecanismo pode se repetir várias vezes; quanto maior o número de ciclos de reprodução assexuada, maior tende a ser a patogenicidade da espécie, devido à intensa destruição do epitélio intestinal. Esse padrão é assim característico de cada espécie de *Eimeria* (MESA-PINEDA et al., 2021; PRATA, 2020).

A gametogonia tem início quando os merozoítos da última geração invadem novos enterócitos e se diferenciam em gametas, microgametas (masculinos) e macrogametas (femininos). A fecundação origina um oocisto imaturo, que é liberado na luz intestinal. No ambiente externo, em condições adequadas de temperatura, umidade e oxigênio, ocorre a esporogonia, processo no qual o oocisto amadurece e se torna infectante, completando o ciclo (ALLEN; FETTERER, 2002; KAWAZOE, 2000).

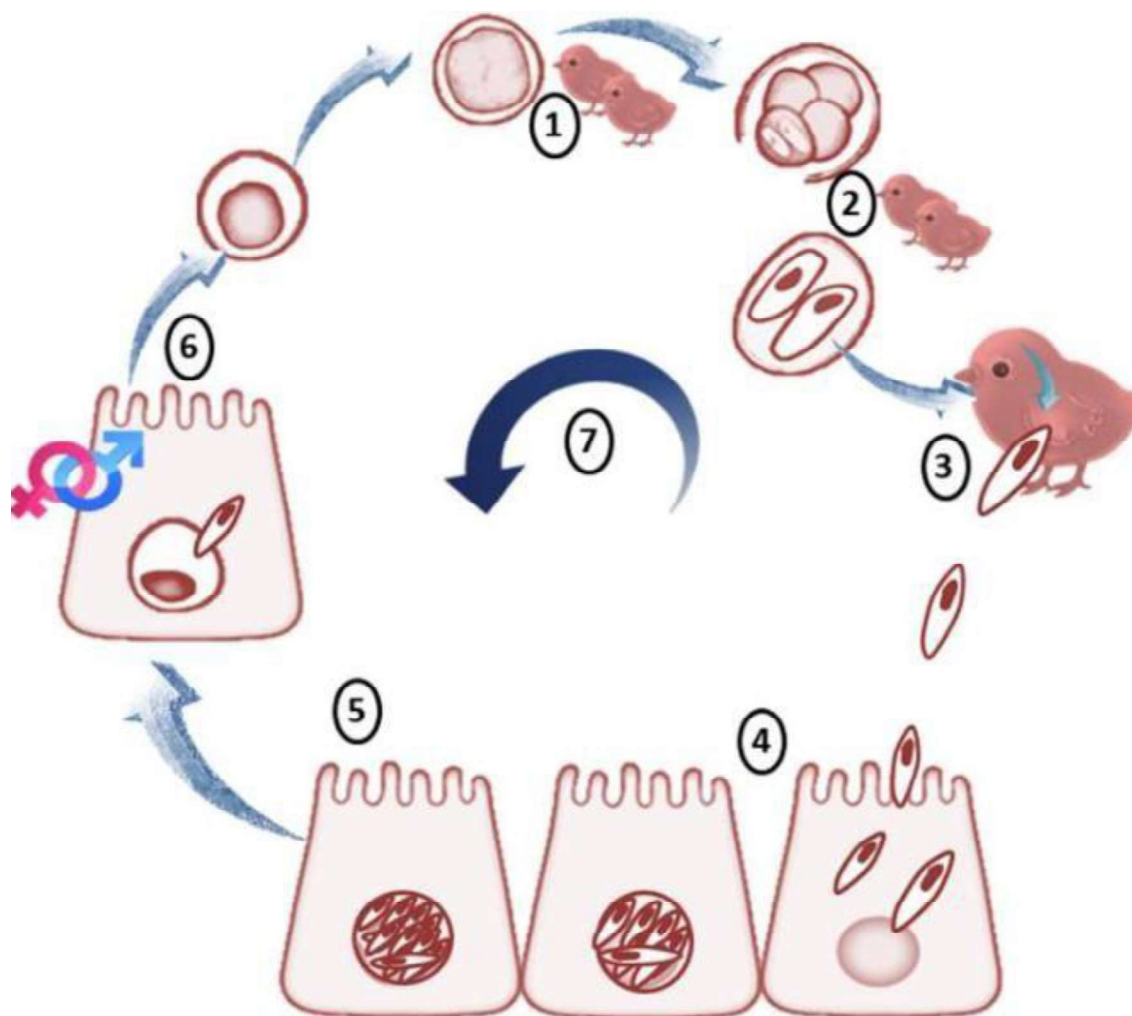


Figura 1. Ciclo biológico *Eimeria* spp. Galinhas e frangos se contaminam pela via fecal-oral, com a reprodução dos protozoários dentro das células intestinais, resultando em dano na parede intestinal (EL-SHALL et al., 2021).

2.3.1 Espécies de *Eimeria* spp

As aves domésticas (*Gallus gallus domesticus*) podem ser acometidas por diferentes espécies do gênero *Eimeria*. Até o momento, foram descritas sete espécies com relevância em frangos de corte: *E. praecox*, *E. acervulina*, *E. máxima*, *E. necatrix*, *E. brunetti*, *E. tenella* e *E. mitis* (VRBA et al., 2010). Cada uma dessas espécies apresenta características distintas quanto à patogenicidade, morfologia dos oocistos e localização preferencial no trato intestinal (BURRELL et al., 2020). . Estas características podem ser observadas no Quadro 1.

Quadro 1. Comparação das sete espécies conhecidas de *Eimeria* spp. que afetam frangos e galinhas em termos de local de infecção, patogenicidade e sinais clínicos.

Espécies	Local de infecção	Patogenicidade	Sinais Clínicos
<i>E. tenella</i>	Ceco	Severa	Excremento sanguinolento, redução do consumo de ração.
<i>E. máxima</i>	Jejuno e Íleo	Moderado à Severo	Diarréia, excremento pode conter sangue.
<i>E. acervulina</i>	Duodeno	Brando	Anemia, enterite leve, perda de apetite.
<i>E. necatrix</i>	Jejuno e Íleo proximal	Severo	Enterite com sangue, queda no consumo de alimento.
<i>E. brunetti</i>	Íleo distal	Severo	Enterite, ocasionalmente com sangue.
<i>E. mitis</i>	Íleo distal	Brando	Enterite limitada ao íleo, diarréia aquosa.
<i>E. praecox</i>	Duodeno e Jejuno proximal	Leve	Conteúdo intestinal aquoso.

Fonte: Quiroz-Castañeda e Dantán-González (2015)

Embora os sinais clínicos causados pelas diferentes espécies de *Eimeria* sejam específicos, de forma geral, as aves apresentam perda de peso, apatia, perda de apetite, diarreia e tendência ao amontoamento (McDONALD; SHIRLEY 2009). Essas manifestações estão relacionadas às alterações nas vilosidades intestinais, que reduzem a capacidade de absorção de nutrientes e comprometem a renovação celular. A destruição das células epiteliais ocasiona a perda de fluidos, hemorragias e maior susceptibilidade a outras doenças (KAWAZOE, 2000). Além disso, a coinfeção com espécies que acometem diferentes regiões ao mesmo tempo intensificam o quadro, agravando a deficiência na absorção de nutrientes (LILLEHOJ H; LILLEHOJ E, 2000).

2.3.2 Diagnóstico da Coccidiose Aviária

O diagnóstico da coccidiose em aves pode ser realizado por métodos macroscópicos e microscópicos, sendo o diagnóstico clássico baseado na avaliação macroscópica dos segmentos intestinais (JOHNSON; REID, 1970). Essa avaliação varia conforme a espécie de *Eimeria* envolvida: para *E. acervulina*, observa-se a presença de placas esbranquiçadas no duodeno; em infecções por *E. maxima*, são identificadas lesões hemorrágicas com espessamento da mucosa no jejuno e início do íleo; já para *E. tenella*, são detectadas áreas de

espessamento e lesões compatíveis com necrose no ceco (PRATA, 2020).

Além da avaliação macroscópica dos segmentos intestinais, o diagnóstico inclui a observação dos sinais clínicos, a análise da qualidade das fezes no ambiente, o que permite a identificação e caracterização dos oocistos quanto ao tamanho e formato (MESA-PINEDA et al., 2021). Adicionalmente, pode-se recorrer à avaliação das alterações teciduais e à confirmação da presença dos parasitas por meio de exames histopatológicos, complementando as análises anteriores e proporcionando um diagnóstico mais preciso (PRATA, 2020).

A coinfeção por diferentes espécies de *Eimeria* é comum na coccidiose à campo (HAUG et al., 2008; JENKINS et al., 2008), o que contribui não apenas para o aumento da patogenicidade, mas também para a dificuldade diagnóstica, pois características morfológicas e alterações patológicas podem ser semelhantes entre as espécies, dificultando a identificação precisa das espécies envolvidas (CARVALHO et al., 2011). Para superar essas limitações, utiliza-se o diagnóstico molecular, que oferece maior precisão diagnóstica por ser um método que oferece maior sensibilidade e especificidade.

2.3.4 Prevenção, tratamento e controle das coccidioses em aves de produção

O aumento da densidade de aves nos aviários, associado à redução do tempo de vazio sanitário entre os lotes, favorece a elevação da concentração de oocistos na cama e, conseqüentemente, eleva o risco de infecção parasitária. Nesse cenário, medidas de manejo, higiene e desinfecção desempenham papel essencial na redução da disseminação do parasita (GAZONI et al., 2020; CEVALLOS-GORDON et al., 2024).

Entretanto, tais medidas nem sempre são suficientes para conter todos os desafios sanitários do campo, especialmente em ambientes com alta pressão de infecção (CEVALLOS-GORDON et al., 2024). Por isso, o uso profilático de anticoccidianos na ração se tornou uma ferramenta essencial para a prevenção. Esses compostos, que podem ser classificados como químicos ou ionóforos, atuam diretamente no ciclo do parasita, inibindo sua multiplicação e resultando em menor dano intestinal.

Em casos de surtos, o tratamento segue protocolos que estabelecem a administração de anticoccidianos na água de bebida ou na dieta, sendo utilizadas sulfonamidas, amprólio ou outros compostos sintéticos (PRATA, 2020). Em frangos de corte, os medicamentos são adicionados à ração no primeiro dia de idade, e retirados antes do abate, respeitando o período de carência de cada molécula, evitando resíduos na carne (ANADON; MARTINEZ-LARRANAGA, 1999).

Embora os anticoccidianos continuem úteis no controle da coccidiose aviária, o uso

contínuo da mesma molécula favorece o surgimento de cepas resistentes por parte das diferentes espécies de *Eimeria* (CHAPMAN; JOHNSON, 1992; JENKINS et al., 2017; NOGUEIRA et al., 2009; ABBAS et al., 2011; LIU et al., 2023). Informações sobre os perfis de sensibilidade de isolados de *Eimeria* spp. a diferentes fármacos são essenciais para o controle eficaz da coccidiose. O Teste de Sensibilidade a Anticoccidianos (TSA), realizado *in vivo* em gaiolas, é o principal método disponível para essa avaliação. Apesar de ser um procedimento demorado e de alto custo, o TSA fornece dados valiosos, e deveria receber mais atenção nos programas de prevenção e manejo da coccidiose (PEEK; LANDMAN, 2011).

Para minimizar esses efeitos da resistência aos anticoccidianos, são utilizados programas de rotação, nos quais anticoccidianos constituídos por diferentes moléculas e mecanismos de ação são alternados ao longo de períodos específicos (LIU et al., 2023). Sendo assim, a análise da variação genética das *Eimeria* spp. se torna um fator importante para entender a dinâmica de uso e controle dos coccídios (MORRIS; GASSER, 2006).

Nesse contexto, a vacinação surge como uma alternativa promissora no controle da coccidiose, pois previne de forma eficaz a doença sem induzir resistência em cepas de campo (DALLOUL et al., 2006; ZAHEER et al., 2022). Elas substituem por completo os tratamentos a campo e os programas anticoccidianos, incluindo ionóforos (PRATA, 2020). Por meio da exposição controlada das aves a oocistos vivos atenuados ou virulentos, estimula-se a resposta imune protetora das aves (PRATA, 2020).

Na década de 1950, foi desenvolvido nos Estados Unidos o primeiro protótipo de vacina comercial contra a eimeriose, que é usada até hoje. Inicialmente, houve preocupação quanto à absorção uniforme da vacina viável e à virulência das cepas vacinais. Como medida de segurança, recomendava-se a associação com proteção quimioterápica para as aves que permanecessem suscetíveis após a vacinação. Essa abordagem abriu caminho para as vacinas vivas atenuadas que continuam sendo utilizadas, predominantemente nos Estados Unidos (WILLIAMS, 2002).

As vias de aplicação da vacina podem ser por spray, realizado em incubatório no primeiro dia de idade em pintos de corte ou postura, e via ocular no campo, esta utilizada apenas em poedeiras, desde que, essa forma de administração induz uma resposta imunológica considerada adequada para garantir proteção contra as eimerias presentes nas vacinas. Essa variação nas vias de aplicação pode estar relacionada a diferentes mecanismos de ativação da resposta imunológica, influenciando a eficácia e a segurança da iminização.

A vacinação em spray, aplicada em massa, exige padronização cuidadosa da dosagem e das condições de aplicação, para assegurar inoculação uniforme entre as aves,

favorecendo a eliminação de oocistos na cama e a reinfecção controlada do lote. A aplicação via ocular é individual, o que garante maior uniformidade, pois cada ave recebe a dose adequada da vacina. Aves que não recebem uma dose adequada podem manter infecções subsequentes, resultando em uma imunidade assincrônica no plantel, comprometendo o desempenho das aves e aumentando a suscetibilidade futura à doença (DANFORTH, 1998; PRATA, 2020).

Vacinas elaboradas a partir de oocistos virulentos, amplamente utilizadas em grande parte da América do Norte, regiões da África e da Ásia, apresentam riscos, como o comprometimento do desempenho do lote e a ocorrência de doença clínica, especialmente se o manejo não for realizado de forma adequada (BLAKE et al., 2020). Por isso, a vacina viva atenuada, na qual a patogenicidade do parasita é diminuída, minimiza os efeitos deletérios no hospedeiro (ZAHEER et al., 2022).

Existem diversos métodos de atenuação dos oocistos, como seleção de precocidade, irradiação, tratamento químico e passagens seriadas em embriões de galinha. As linhagens precoces de *Eimeria* são caracterizadas por um ciclo de vida endógeno encurtado devido à eliminação de uma ou mais esquizogonias (MESA-PINEDA et al., 2021; LIU et al., 2023). Tentativas de desenvolver novas vacinas utilizaram a tecnologia de identificação de antígenos protetores, o que resultou na descoberta de numerosos candidatos vacinais em potencial (MESA-PINEDA et al., 2021).

Entre as vantagens de determinadas vacinas, destaca-se o fato de que, além de induzirem uma resposta imune capaz de conferir proteção contra os efeitos patológicos da infecção, seu uso pode levar à restauração da sensibilidade aos fármacos (VERECKEN et al., 2021). No entanto, a escolha da vacina ideal requer cuidados quanto à segurança, eficácia e as características do plantel, considerando fatores como idade, via de aplicação, imunogenicidade, proteção cruzada e sensibilidade aos fármacos (ZAHEER et al., 2022).

2.4 Barreira Intestinal e Resposta Imune do Intestino

As células epiteliais intestinais são as principais responsáveis pela manutenção da integridade da barreira intestinal e atuam como reguladoras fundamentais da imunidade inata e adaptativa (YUN et al., 2000). O epitélio da mucosa do trato digestivo funciona como uma barreira seletiva, permeável a íons, nutrientes e macromoléculas. Além de sua função física, essa barreira secreta substâncias químicas que combatem bactérias, vírus e parasitas (TURNER, 2009; YUN et al., 2000).

A manutenção dessa barreira depende de complexos multiproteicos formados por

proteínas transmembrana, como claudinas, ocludina e moléculas de adesão juncional (JAMs), que se conectam ao citoesqueleto de actina por meio de proteínas citoplasmáticas, como as *Zonulas Occludens* (ZO-1, ZO-2). As claudinas são os principais reguladores do transporte paracelular de íons, enquanto a ocludina controla a permeabilidade, sendo sensível a estresse oxidativo e processos inflamatórios. O ZO-1 é essencial para a estabilidade estrutural das junções, assegurando a vedação que mantém a polaridade celular e regula a passagem seletiva de solutos entre os compartimentos luminal e basolateral (TURNER, 2009; CHENG et al., 2019; AWAD, 2017). A ZO-2 atua de forma complementar, participando da organização das junções de oclusão e também desempenhando funções nucleares, como regulação da transcrição gênica e sinalização celular, o que a torna importante não apenas para a integridade da barreira epitelial, mas também para processos de diferenciação e resposta ao estresse celular (GONZÁLEZ-MARISCAL et al., 2000; RODRÍGUEZ-BASURTO et al., 2017).

Essa barreira física não atua isoladamente. Suas proteínas e marcadores celulares interagem diretamente com componentes do sistema imunológico, formando uma rede complexa que modula a resposta contra o parasita e mantém a homeostase tecidual do intestino (LIMA et al., 2025). O desenvolvimento da imunidade é fundamental para a resistência das aves à coccidiose, diminuindo a liberação de oocistos (CHAPMAN; JOHNSON, 1992). A infecção por *Eimeria* desencadeia respostas imunes específicas e inespecíficas. A imunidade específica envolve mecanismos celulares e humorais, conferindo proteção contra reinfecções (LILLEHOJ et al., 1996; LILLEHOJ et al., 2004). Essa imunidade é específica para cada espécie de *Eimeria*, de modo que frangos imunes a uma espécie podem permanecer suscetíveis a outras (YUN et al., 2000).

Esse complexo sistema de defesa envolve a produção de citocinas por diversos tipos celulares, que ativam e regulam o sistema imunológico durante a infecção e/ou após a vacinação (WIGLEY et al., 2003). Os monócitos são algumas das primeiras células a responderem à infecção, e produzem Interleucina-1 beta (IL-1 β) em casos de lesão intestinal. Essa citocina contribui para a manutenção da tolerância à microbiota benéfica e para o combate a patógenos, sendo essencial tanto para a defesa contra protozoários quanto para o equilíbrio do ambiente intestinal, participando da resposta inflamatória inicial (DUAN et al., 2024).

A Interleucina-6 (IL-6), uma citocina multifuncional envolvida em reações de fase aguda, doenças autoimunes e processos hematopoiéticos, com papel relevante na doença inflamatória intestinal, também é produzida no início da inflamação. IL-6 atua na maturação final das células B produtoras de anticorpos (YU et al., 2020; LEE et al., 2022). Enquanto a Interleucina-8 (IL-8), produzida por diversas células, incluindo epiteliais e endoteliais, exerce

função quimiotática, recrutando células imunes ao local da lesão, contribuindo tanto para a resistência contra patógenos quanto para a reparação tecidual (WIGLEY et al., 2003; YU et al., 2020).

Os linfócitos T auxiliares do subtipo Th1 produzem citocinas como o Interferon-gama (IFN- γ), que desempenha papel fundamental na imunidade contra *Eimeria*. A ativação dessas células ocorre no local da infecção, promovendo a produção local de IFN- γ e regulando a resposta anticoccidiana. O subtipo Th1 também produz Interleucina-2 (IL-2), responsável pelo crescimento de células T e pela ativação de macrófagos, estimulando o desenvolvimento da resposta imune mediada por células (WIGLEY et al., 2003; KIM et al., 2019). Estudos demonstraram aumento significativo dos níveis de IL-2 no baço e intestino após infecções primárias e secundárias por *Eimeria acervulina*, enquanto em infecções por *Eimeria tenella* houve redução expressiva dessa citocina (HONG et al., 2006).

Células produtoras de IFN- γ também estão presentes no sangue e no baço, podendo migrar após infecção secundária. Em aves com coccidiose, essa citocina é produzida por linfócitos do sangue periférico estimulados por *Eimeria*, sendo que células T citotóxicas (CD8⁺) também secretam IFN- γ , contribuindo para a imunorregulação da infecção primária. Frangos imunizados com IFN- γ recombinante apresentaram menor eliminação de oocistos e maior ganho de peso após infecção por *E. acervulina*, além de inibir a invasão de esporozoítos de *E. tenella* em células de galinhas *in vitro* (WIGLEY et al., 2003; KIM et al., 2019; LEE et al., 2022; DIMIER et al., 1998).

Os linfócitos Th2 produzem Interleucina-10 (IL-10) que induz a resposta humoral e inibe a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α e IL-6, modulando a resposta inflamatória Th1. A expressão de mRNA de IL-10 aumenta significativamente após infecção por *Eimeria maxima*, enquanto outras infecções primárias por *E. acervulina* ou *E. tenella* apresentam aumento moderado, destacando a importância das células Th2 na defesa humoral contra a invasão parasitária (WIGLEY et al., 2003; HONG et al., 2006).

De forma semelhante, células Th3 produzem o Fator Transformador de Crescimento Beta (TGF- β) em resposta ao antígeno. Essa citocina é fundamental para o desenvolvimento de linfócitos T e exerce atividade anti-inflamatória (WIGLEY et al., 2003). Segundo HONG et al. (2006), o TGF- β apresenta leve aumento nos estágios finais da infecção primária por *E. acervulina* e um padrão bifásico em infecções por *E. tenella*, possivelmente relacionado à supressão da resposta inflamatória.

As citocinas IL-10 e TGF- β estão associadas ao perfil das células T reguladoras (Tregs), assim como o antígeno 4 de linfócito T citotóxico (CTLA-4), presente na superfície das células

T. A infecção por *Eimeria* desencadeia a expressão de Tregs, que aumentam a produção dessas citocinas anti-inflamatórias (YU et al., 2021; PU et al., 2023).

Em infecções primárias por *Eimeria* em galinhas, observa-se aumento na quantidade de células CD8+ com antígenos específicos, ressaltando o papel crucial dessas células na imunidade anticoccidiana. Durante a resposta imune, linfócitos T auxiliares (CD4+) e citotóxicos (CD8+) são ativados e modulam a expressão de diferentes reguladores imunológicos distintos, contribuindo de maneiras distintas para a defesa do hospedeiro em infecções primárias e secundárias (LEE et al., 2022).

As interleucinas e os marcadores celulares formam uma rede complexa que modula a resposta imune contra o parasita, contribuindo para a manutenção da homeostase tecidual (LIMA et al., 2025). A análise dessa interação entre hospedeiro e parasita - envolvendo a barreira intestinal, a expressão de marcadores celulares e a produção de citocinas - é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle da coccidiose (YUN et al., 2000).

2.5 Microbiota

O trato gastrointestinal das aves domésticas abriga uma microbiota complexa e diversa, composta por bactérias, vírus, protozoários e fungos, sendo a população bacteriana predominante e estabelecendo uma relação simbiótica benéfica com o hospedeiro (DAS et al., 2021). Essas bactérias podem ser classificadas em dominantes, subdominantes e residuais, conforme sua concentração. Do papo ao íleo distal, observa-se o predomínio de bactérias Gram-positivas anaeróbias facultativas, enquanto os cecos apresentam maior diversidade microbiana, incluindo bactérias Gram positivas como *Lactobacillus* e *Enterococcus*; Gram negativas, como os coliformes; além de leveduras, todos também capazes de sobreviver tanto na presença quanto na ausência de oxigênio (YADAV; JHA, 2019).

A microbiota intestinal desempenha um papel essencial na formação e manutenção da estrutura epitelial, além de estimular respostas imunológicas, proteger contra patógenos luminais e participar da digestão e absorção de nutrientes (DAS et al., 2021; LIU et al., 2024). Uma de suas funções mais relevantes é a fermentação de polissacarídeos complexos presentes nas paredes celulares das plantas, promovendo a liberação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como acetato, propionato e butirato (MAHMOOD; GUO, 2020). Entre os grupos bacterianos responsáveis pelo metabolismo de carboidratos e proteínas, que contribuem para a fermentação de substratos não digeríveis e a produção de energia por meio da geração desses metabólitos, destacam-se os filos Firmicutes e Bacteroidetes. (OAKLEY et al., 2014). Juntos, esses filos compreendem mais de 80% da microbiota intestinal total de frangos (ONRUST et

al. 2015). Uma microbiota saudável pode apresentar alta diversidade (DUCATELLE et al., 2015). Entretanto, uma diversidade mais limitada também pode ser desejável, uma vez que nem todos os microrganismos que compõem uma microbiota altamente diversa são benéficos ao hospedeiro, seja por incluírem patógenos, seja por englobarem cepas oportunistas com baixa contribuição funcional (GONG et al., 2019).

A composição da microbiota intestinal pode variar devido a fatores como dieta, sexo, idade, genética, tipo e condições da cama (POWER et al., 2014; XUE et al., 2025). O desenvolvimento da microbiota intestinal nos primeiros dias de vida é crucial para a conversão alimentar e o desempenho de crescimento de frangos de corte (RYCHLIK, 2020). Nos primeiros dias, a microbiota intestinal ainda está na fase de formação, sendo gradualmente substituída por uma comunidade estável à medida que as aves se adaptam ao ambiente. Durante o período de rápido crescimento, entre 14 e 21 dias, a estrutura microbiana se mantém relativamente constante. No entanto, alterações na dieta, podem provocar modificações significativas, observadas entre os dias 35 e 42, período de rápido ganho de peso, resultando em uma diminuição expressiva da diversidade da microbiota intestinal (LI et al., 2022).

Além dos fatores mencionados, características bioquímicas do intestino, como o pH, também influenciam a composição microbiana. Valores baixos de pH limitam o crescimento bacteriano, inibindo a maioria das bactérias e patógenos. Espécies como *Lactobacillus* produzem ácido láctico e AGCC nos intestinos das aves, reduzindo o pH intestinal e, consequentemente, modulando a composição e a diversidade da microbiota (XIAO et al., 2021).

Em casos de infecção por *Eimeria*, há comprometimento da integridade da mucosa intestinal, desencadeando a disbiose no sítio-alvo da infecção. Esse quadro é caracterizado pela redução de bactérias benéficas e pelo aumento de microrganismos potencialmente patogênicos, prejudicando o funcionamento fisiológico do trato intestinal e favorecendo a colonização e proliferação de outros patógenos, o que pode agravar os danos à mucosa e comprometer a saúde do hospedeiro (DUCATELLE et al., 2015; MADLALA et al., 2021).

Dentre os efeitos da disbiose cecal, observa-se a redução da população de bactérias comensais, como os Firmicutes (principalmente Ruminococcaceae) e produtores de AGCC, além de bactérias imunomoduladoras, como *Candidatus savagella* e grupos Bacillales e Lactobacillales. Por outro lado, ocorre o aumento de bactérias potencialmente patogênicas, como *Clostridium* spp., que favorecem a replicação da coccídia e provocam danos severos à mucosa intestinal (MADLALA et al., 2021).

O aumento da abundância de cepas bacterianas comensais pode conferir maior

resistência à infecção por *Eimeria*, inibindo a colonização de patógenos intestinais. Espécies do gênero *Lactobacillus* são capazes de modular o sistema imunológico inato e adaptativo das aves, contribuindo para a resistência a infecções bacterianas e parasitárias (MACDONALD et al., 2017).

Dessa forma, a alteração da microbiota intestinal pode comprometer funções essenciais, evidenciando a necessidade de aprofundarmos o conhecimento sobre microbiomas saudáveis e compreender os impactos da exposição a patógenos no microbioma, de modo a aprimorar estratégias de controle e contribuir para a manutenção da saúde intestinal das aves.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. [Informações sobre produção animal no Brasil]. Disponível em: <https://abpa-br.org/> Acesso em: 12 ago. 2025.
- ABBAS, R. Z. et al. Anticoccidial drug resistance in fowl coccidia: the state of play revisited. *World's Poultry Science Journal*, Cambridge, v. 67, n. 2, p. 337-350, 2011. doi: 10.1017/S004393391100033X.
- ALLEN, P. C.; FETTERER, R. H. Recent advances in biology of *Eimeria* species and diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 15, n. 1, p. 58-65, 2002. doi: 10.1128/CMR.15.1.58-65.2002.
- ANADON, A.; MARTINEZ-LARRANAGA, M. R. Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects. *Livestock Production Science*, Amsterdam, v. 59, n. 2-3, p. 183-198, 1999. doi: 10.1016/S0301-6226(99)00026-5.
- AWAD, W. A.; HESS, C.; HESS, M. Enteric pathogens and their toxin-induced disruption of the intestinal barrier through alteration of tight junctions in chickens. *Toxins*, Basel, v. 9, n. 2, p. 60, 2017. doi: 10.3390/toxins9020060.
- BASSI, N.; SILVA, C. Oportunidades e desafios em PD&I na cadeia produtiva de frangos de corte. *Avicultura Industrial*, Concórdia, ed. 1271, v. 109, n. 10, p. 16-21, 2017.
- BLAKE, D. P. et al. Re-calculating the cost of coccidiosis in chickens. *Veterinary Research*, Paris, v. 51, n. 115, p. 1-14, 2020. doi: 10.1186/s13567-020-00837-2.
- BLAKE, D. P.; TOMLEY, F. M. Securing poultry production from the ever-present *Eimeria* challenge. *Trends in Parasitology*, Amsterdam, v. 30, n. 1, p. 12-19, 2014. doi:

10.1016/j.pt.2013.10.003.

BURRELL, A.; TOMLEY, F. M.; VAUGHAN, S.; MARUGAN-HERNANDEZ, V. Life cycle stages, specific organelles and invasion mechanisms of *Eimeria* species. *Parasitology*, Cambridge, v. 147, n. 3, p. 263-278, 2020. doi: 10.1017/S0031182019001562.

CARVALHO, F. S. et al. Diagnosis of *Eimeria* species using traditional and molecular methods in field studies. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 176, n. 2-3, p. 95-100, 2011. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.11.024.

CERVANTES, H. M.; MCDOUGALD, L. R.; JENKINS, M. C. Coccidiosis. In: SWAYNE, D. E. (ed.). *Diseases of Poultry*. 14. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2020. v. 2, p. 1193-1217.

CEVALLOS-GORDON, A. et al. Prevalence and risk factors of *Eimeria* spp. in broiler chickens from Pichincha and Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador. *Pathogens*, Basel, v. 13, n. 1, p. 48, 2024. doi: 10.3390/pathogens13010048.

CHAPMAN, H. D.; JOHNSON, Z. B. Oocysts of *Eimeria* in the litter of broilers reared to eight weeks of age before and after withdrawal of lasalocid or salinomycin. *Poultry Science*, Oxford, v. 71, n. 8, p. 1342-1347, 1992. doi: 10.3382/ps.0711342.

CHENG, Y. F. et al. Dietary mannan oligosaccharide ameliorates cyclic heat stress-induced damages on intestinal oxidative status and barrier integrity of broilers. *Poultry Science*, Oxford, v. 98, n. 10, p. 4767-4776, 2019. doi: 10.3382/ps/pez249.

DALLOUL, R. A.; LILLEHOJ, H. S. Coccidiose avícola: avanços recentes em medidas de controle e desenvolvimento de vacinas. *Expert Review of Vaccines*, London, v. 5, n. 1, p. 143-163, 2006. doi: 10.1586/14760584.5.1.143.

DAS, Q. et al. Effects of vaccination against coccidiosis on gut microbiota and immunity in broiler fed bacitracin and berry pomace. *Frontiers in Immunology*, Lausanne, v. 12, p. 621803, 2021. doi: 10.3389/fimmu.2021.621803.

DIMIER, I. H. et al. Inhibition of *Eimeria tenella* development in vitro mediated by chicken macrophages and fibroblasts treated with chicken cell supernatants with IFN- γ activity. *Avian Diseases*, Jacksonville, v. 42, n. 2, p. 239-247, 1998. doi: 10.2307/1592493.

DUAN, C. et al. Expression of IL-1 β in transgenic *Eimeria necatrix* enhances the immunogenicity of parasites and promotes mucosal immunity against coccidiosis. *Frontiers*

in Immunology, Lausanne, v. 15, p. 1435702, 2024. doi: 10.3389/fimmu.2024.1435702.

DUCATELLE, R.; EECKHAUT, V.; HAESEBROUCK, F.; VAN IMMERSEEL, F. A review on prebiotics and probiotics for the control of dysbiosis: present status and future perspectives. *Animal*, Cambridge, v. 9, p. 43-48, 2015. doi: 10.1017/S1751731114002584.

EL-SHALL, N. A. et al. Phytochemical control of poultry coccidiosis: a review. *Poultry Science*, Oxford, v. 101, n. 1, p. 101542, 2022. doi: 10.1016/j.psj.2021.101542.

FATOBA, A. J.; ADELEKE, M. A. Diagnosis and control of chicken coccidiosis: a recent update. *Journal of Parasitic Diseases*, Basingstoke, v. 42, n. 4, p. 483-493, 2018. doi: 10.1007/s12639-018-1048-1.

FERNANDO, M. A.; MCCRAW, B. M. Mucosal morphology and cellular renewal in the intestine of chickens following a single infection of *Eimeria acervulina*. *The Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 59, n. 3, p. 493-501, 1973. doi: 10.2307/3278798.

GAZONI, F. L. et al. Correlation between intestinal health and coccidiosis prevalence in broilers in Brazilian agroindustries. *Parasitology International*, Amsterdam, v. 76, p. 102027, 2020. doi: 10.1016/j.parint.2019.102027.

GONZÁLEZ-MARISCAL, L.; BETANZOS, A.; NAVA, P.; JARAMILLO, B. E. Tight junction proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 81, n. 1, p. 1–44, 2003.

GUO, P. et al. The digestive tract histology and geographical distribution of gastrointestinal microbiota in yellow-feather broilers. *Poultry Science*, Oxford, v. 102, n. 10, p. 102844, 2023. doi: 10.1016/j.psj.2023.102844.

HONG, Y. H. et al. Analysis of chicken cytokine and chemokine gene expression following *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Amsterdam, v. 114, n. 3-4, p. 209-223, 2006. doi: 10.1016/j.vetimm.2006.07.007.

JENKINS, M. C.; PARKER, C.; RITTER, D. *Eimeria* oocyst concentrations and species composition in litter from commercial broiler farms during anticoccidial drug or live *Eimeria* oocyst vaccine control programs. *Avian Diseases*, Jacksonville, v. 61, n. 2, p. 214-220, 2017. doi: 10.1637/11578-010317-Reg.

KAWAZOE, U.; et al. Characterisation and histopathological observations of a selected Brazilian precocious line of *Eimeria acervulina*. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v.

131, n. 1-2, p. 5-14, 2005. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.03.038.

PRATA, M. C. Coccidiose. In: ANDREATTI FILHO, R. L.; BERCHIERI FILHO, Â.; FERNANDES, V. H.; GIVISIEZ, A. M.; RODRIGUES, C. R.; ALMEIDA JUNIOR, O. S.

(org.). *Doenças das aves*. 3. ed. Campinas: FACTA, 2020. p. 609-627.

KIM, W. H.; CHAUDHARI, A. A.; LILLEHOJ, H. S. Involvement of T cell immunity in avian coccidiosis. *Frontiers in Immunology*, Lausanne, v. 10, p. 2732, 2019. doi: 10.3389/fimmu.2019.02732.

LEE, Y.; LU, M.; LILLEHOJ, H. S. Coccidiosis: recent progress in host immunity and alternatives to antibiotic strategies. *Vaccines*, Basel, v. 10, n. 2, p. 215, 2022. doi: 10.3390/vaccines10020215.

LESHCHINSKY, T. V.; KLASING, K. C. Divergence of the inflammatory response in two types of chickens. *Developmental & Comparative Immunology*, Oxford, v. 25, n. 7, p. 629-638, 2001. doi: 10.1016/S0145-305X(01)00023-4.

LI, M. H. et al. Dynamic description of temporal changes of gut microbiota in broilers. *Poultry Science*, v. 101, n. 9, p. 102037, set. 2022. DOI: 10.1016/j.psj.2022.102037.

LILLEHOJ, H. S.; LILLEHOJ, E. P. Avian coccidiosis: a review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies. *Avian Diseases*, Jacksonville, v. 44, p. 408-425, 2000. doi: 10.2307/1592556.

LILLEHOJ, H. S.; TROUT, J. M. Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 9, n. 3, p. 349-360, 1996. doi: 10.1128/CMR.9.3.349-360.1996.

LILLEHOJ, H. S.; MIN, W.; DALLOUL, R. A. Recent progress on the cytokine regulation of intestinal immune responses to *Eimeria*. *Poultry Science*, Oxford, v. 83, n. 4, p. 611-623, 2004. doi: 10.1093/ps/83.4.611.

LIU, J. et al. Dynamic response of the intestinal microbiome to *Eimeria maxima*-induced coccidiosis in chickens. *Microbiology Spectrum*, Washington, v. 12, n. 10, p. e0082324, 2024. doi: 10.1128/spectrum.00823-24.

LIU, Q. et al. Live attenuated anticoccidial vaccines for chickens. *Trends in Parasitology*, Amsterdam, v. 39, n. 12, p. 1087-1099, 2023. doi: 10.1016/j.pt.2023.09.002.

- MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, v. 3, p. 31, 2015. doi: 10.1186/s40168-015-0094-5
- MADLALA, T.; OKPEKU, M.; ADELEKE, M. A. Understanding the interactions between *Eimeria* infection and gut microbiota, towards the control of chicken coccidiosis: a review. *Parasite*, v. 28, p. 48, 2021. doi: 10.1051/parasite/2021047.
- MACDONALD, S. E. et al. Effects of *Eimeria tenella* infection on chicken caecal microbiome diversity, exploring variation associated with severity of pathology. *PLoS ONE*, v. 12, n. 9, e0184890, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0184890.
- MAHMOOD, T.; GUO, Y. Dietary fiber and chicken microbiome interaction: Where will it lead to? *Animal Nutrition*, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2020. DOI: 10.1016/j.aninu.2019.11.004.
- MCDONALD, V.; SHIRLEY, M. W. Past and future: vaccination against *Eimeria*. *Parasitology*, Cambridge, v. 136, n. 12, p. 1477-1489, out. 2009. doi: 10.1017/S0031182009006349.
- MESA-PINEDA, C. et al. Chicken coccidiosis: from the parasite lifecycle to control of the disease. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 8, p. 787653, dez. 2021. doi: 10.3389/fvets.2021.787653.
- NOGUEIRA, V. A.; FRANÇA, T. N.; PEIXOTO, P. V. Ionophore poisoning in animals. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 29, p. 191-197, 2009.
- OAKLEY, B. B. Et al. O microbioma gastrointestinal do frango. *FEMS Microbiology Letters*, v. 360, p. 100–112, 2014. DOI: 10.1111/1574-6968.12608.
- PEEK, H. W.; LANDMAN, W. J. M. Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. *Veterinary Quarterly*, v. 31, n. 3, p. 143-161, 2011. doi: 10.1080/01652176.2011.605247.
- POWER, S. E. et al. Intestinal microbiota, diet and health. *British Journal of Nutrition*, v. 111, p. 387–402, 2014. DOI: 10.1017/S0007114513002560.
- PU, X. et al. Inhibitory effect of *Eimeria maxima* IFN- γ inhibitory molecules on the immune function of T cell subsets in chickens. *Poultry Science*, v. 102, n. 12, p. 103098, dez. 2023. doi:

10.1016/j.psj.2023.103098.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E.; DANTÁN-GONZÁLEZ, E. Control of avian coccidiosis: future and present natural alternatives. *BioMed Research International*, 2015, Art. 430610, 2015. doi: 10.1155/2015/430610.

REMMAL, A. et al. Destruição in vitro de oocistos de *Eimeria* por óleos essenciais. *Veterinary Parasitology*, v. 182, p. 121-126, 2011. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.06.002.

RYCHLIK, I. Composition and function of chicken gut microbiota. *Animals (Basel)*, v. 10, n. 1, p. 103, 8 jan. 2020. DOI: 10.3390/ani10010103

SAKAMOTO, K. S. et al. The challenges of animal welfare in modern Brazilian poultry farming. *Journal of Animal Behaviour and Biometeorology*, v. 8, n. 2, p. 131-135, 2020. doi: 10.31893/jabb.20018.

SWINKELS, W. J. C. et al. Immune responses to an *Eimeria acervulina* infection in different broiler lines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 117, n. 1-2, p. 26-34, 2007. doi: 10.1016/j.vetimm.2007.01.020.

TURNER, J. R. Função da barreira da mucosa intestinal na saúde e na doença. *Nature Reviews Immunology*, v. 9, p. 799-809, 2009. doi: 10.1038/nri2653.

VEREECKEN, M. et al. Restoration of the sensitivity of *Eimeria acervulina* to anticoccidial drugs in the chicken following use of a live coccidiosis vaccine. *Veterinary Parasitology*, v. 292, Art. 109416, 2021.

VRBA, V.; BLAKE, D. P.; POPLSTEIN, M. Quantitative real-time PCR assays for detection and quantification of all seven *Eimeria* species that infect the chicken. *Veterinary Parasitology*, v. 174, p. 183-190, 2010. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.09.006.

XUE, N. et al. Comparison of Gut Microbiome Profile of Chickens Infected with Three *Eimeria* Species Reveals New Insights on Pathogenicity of Avian Coccidia. *Microorganisms*. 2025 Dec 3;13(12):2752. doi: 10.3390/microorganisms13122752.

XIAO, S. S. et al. Microbial diversity and community variation in the intestines of layer chickens. *Animals (Basel)*, v. 11, n. 3, p. 840, 2021. DOI: 10.3390/ani11030840.

WIGLEY, P.; KAISER, P. Avian cytokines in health and disease. *Brazilian Journal of Poultry*

Science, v. 5, p. 1-14, 2003.

WILLIAMS, R. B. Fifty years of anticoccidial vaccines for poultry (1952–2002). *Avian Diseases*, v. 46, n. 4, p. 775-802, out. –dez. 2002. doi: 10.1637/0005-2086(2002)046[0775:FYOAVF]2.0.CO;2

YAMADA, T. et al. IL-1 induced chemokine production through the association of Syk with TNF receptor-associated factor-6 in nasal fibroblast lines. *Journal of Immunology*, v. 167, n. 1, p. 283-288, 2001.

YU, H. et al. Research Note: Correlation analysis of interleukin-6, interleukin-8, and CC motif chemokine ligand 2 gene expression in chicken spleen and cecal tissues after *Eimeria tenella* infection in vivo. *Poultry Science*, v. 99, n. 3, p. 1326-1331, 2020.

YUN, C. H.; LILLEHOJ, H. S.; LILLEHOJ, E. P. Intestinal immune responses to coccidiosis. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 24, n. 2-3, p. 303-324, 2000.

ZAHEER, T. et al. Vaccines against chicken coccidiosis with particular reference to previous decade: progress, challenges, and opportunities. *Parasitology Research*, v. 121, p. 2749-2763, 2022. doi: 10.1007/s00436-022-07612-6.

CAPÍTULO I

Este capítulo foi publicado como artigo em:

Lima et al. Dose and age-dependent effects of *Eimeria* spp. infection on cytokine and intestinal integrity gene expression in broiler chickens. *Vet Parasitol.* 2025 Aug; 338:110550. doi: 10.1016/j.vetpar.2025.110550.

EFEITOS DA INFECÇÃO POR EIMERIA SPP. NA EXPRESSÃO DE CITOCINAS E GENES DE INTEGRIDADE INTESTINAL EM FRANGOS DE CORTE: INFLUÊNCIA DA DOSE E DA IDADE

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da dose do desafio vacinal com *Eimeria* spp. e da idade na expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias, além de marcadores de integridade intestinal em frangos de corte. Pintinhos de um dia de idade foram desafiados por via oral com uma vacina comercial em doses 10× (G1) e 40× (G2) maiores do que as recomendadas pelo fabricante, enquanto o grupo controle (GC) recebeu PBS. Os frangos de corte foram eutanasiados aos 7, 14 e 21 dias pós-infecção (dpi) para coleta de tecido cecal. Os resultados revelaram uma ruptura precoce da barreira intestinal aos 7 dpi, especialmente em G2, quando os genes das junções apertadas (ZO-A, claudina-C e JAM) foram significativamente regulados para baixo. Aos 14 dpi, a expressão do gene occludina aumentou em G2, sugerindo uma tentativa compensatória de restaurar a integridade intestinal. A resposta imune seguiu um padrão distinto, dependendo da dose e da idade. Aos 14 dpi, as citocinas pró-inflamatórias IL1 β , IL2 e IFN- γ atingiram pico em ambos os grupos, embora a resposta tenha sido mais forte em G1, indicando uma ativação mais controlada. Entretanto, aos 21 dpi, G2 mostrou uma supressão marcada de IL10 e IFN- γ . Em contraste, a expressão de CD8 foi fortemente regulada para cima em G2 aos 21 dpi, indicando uma resposta citotóxica retardada, porém intensificada. Curiosamente, apesar das alterações na expressão das citocinas, os marcadores de integridade intestinal apresentaram mudanças limitadas ao longo do tempo, sugerindo que a resposta imune foi mais afetada pela carga parasitária do que por danos estruturais no intestino. Esses achados destacam como a dose e a idade moldam a resposta do hospedeiro à infecção por *Eimeria* spp., e enfatizam a importância de estratégias específicas de manejo da coccidiose na produção avícola.

Palavras-chave: *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, Coccidiose, Saúde intestinal, Frangos de corte.

DOSE AND AGE-DEPENDENT EFFECTS OF *EIMERIA* SPP. INFECTION ON CYTOKINE AND INTESTINAL INTEGRITY GENE EXPRESSION IN BROILER CHICKENS

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of *Eimeria* spp. challenge dose and age on gene expression of pro-and anti-inflammatory cytokines and intestinal integrity markers in broiler chickens. One-day-old chicks were orally challenged with a commercial vaccine at doses of $10 \times$ (G1) and $40 \times$ (G2) higher than those recommended by the manufacturer, whereas the control group (GC) received PBS. Broiler chickens were euthanized at 7, 14, and 21 days post-infection (dpi) for cecal tissue collection. The results revealed early intestinal barrier disruption at 7 dpi, particularly in G2, when tight junction genes (*ZO-A*, *claudin-C*, and *JAM*) were significantly downregulated. By 14 dpi, *occludin* gene expression had increased in G2, suggesting a compensatory attempt to restore gut integrity. The immune response followed a distinct pattern depending on dose and age. At 14 dpi, the pro-inflammatory cytokines *IL1 β* , *IL2*, and *IFN- γ* peaked in both groups, although the response was stronger in G1, indicating more controlled activation. However, by 21 dpi, G2 showed marked suppression of *IL10* and *IFN- γ* . In contrast, *CD8* expression was strongly upregulated in G2 at 21 dpi, indicating a delayed but heightened cytotoxic response. Interestingly, despite shifts in cytokine expression, intestinal integrity markers showed only limited changes over time, suggesting that the immune response was more affected by parasite load than by structural damage to the gut. These findings highlight how dose and age shape the host response to *Eimeria* spp., and emphasize the importance of tailored coccidiosis management strategies in poultry production.

Key-words: *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, Coccidiosis, Cytokine expression, Gut health, Broilers.

1. INTRODUÇÃO

A coccidiose aviária é uma doença parasitária intestinal causada pelo protozoário intracelular *Eimeria* spp. O custo total associado à profilaxia, tratamento e perdas na produção devido à coccidiose é estimado em aproximadamente 13 bilhões de dólares por ano na indústria avícola (Alam et al., 2022). Sete espécies de *Eimeria* são reconhecidas pelo seu impacto significativo na produção avícola: *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. praecox*, *E. mitis*, *E. necatrix* e *E. tenella*. Cada espécie apresenta patogenicidade variável e tropismo em diferentes regiões do trato intestinal (Blake; Tomley, 2014; El-Shall et al., 2022). Entre essas espécies, *Eimeria tenella* é uma das mais patogênicas, causando enterite hemorrágica aguda devido à sua ação sobre as células epiteliais das criptas cecais (Tomal et al., 2023; Blake et al., 2015). A destruição do epitélio cecal compromete a homeostase intestinal, prejudicando a absorção de água, eletrólitos e ácidos graxos voláteis resultantes da fermentação microbiana, (Svihus et al., 2013), ocasionando redução no ganho de peso e aumento na conversão alimentar, o que afeta significativamente a produção avícola (Zhang et al., 2012; Huang et al., 2018).

Em condições normais, o epitélio intestinal funciona como uma barreira protetora natural, com células epiteliais interconectadas por junções de adesão (tight junctions - TJs), que previnem e regulam a invasão microbiana (Rodríguez et al., 2023; Hu et al., 2015; Al-Sadi et al., 2009). As junções de adesão contêm proteínas como occludina (Occludin), claudina (Claudin-C) e moléculas de adesão junção (JAM), que facilitam a adesão célula a célula no epitélio cecal. Além disso, fibras de actina-miosina do citoesqueleto, ligadas por proteínas citoplasmáticas das junções de adesão, formam a zonula Occludinens (ZO), estabelecendo uma barreira à entrada de macromoléculas entre as células. Portanto, a regulação adequada da expressão gênica é essencial para a manutenção da integridade intestinal (Kaminsky et al., 2021; Cheng et al., 2019).

Durante a infecção por *Eimeria* spp., os esporozoítos não apenas rompem as junções de adesão, mas também estimulam respostas imunes inatas e adaptativas, tanto humoral quanto celular (Wang et al., 2024). A resposta imune desencadeada pelos esporozoítos de *Eimeria* spp. leva a uma forte reação imune específica da espécie que pode prevenir a reinfecção (Zhou et al., 2023). Nas infecções por *Eimeria* spp., a invasão e destruição tecidual podem alterar a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, como IL1 β , IL2, IL6, IL8 e IFN- γ , nos locais de infecção e lesões. Esses processos regulam e ativam células T (CD4 e CD8) e modificam a expressão gênica de reguladores imunes, como a proteína associada a linfócitos T citotóxicos 4 (CTLA-4) e citocinas anti-inflamatórias, como TGF- β e IL-10.

Assim, as interleucinas e marcadores celulares formam uma rede complexa que interage e modula a resposta imune contra o parasita, ao mesmo tempo em que mantém a homeostase (Nawab et al., 2019; Macdonald et al., 2017; Wattrang et al., 2023).

Entre as citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e IL-6 desempenham papéis importantes durante os estágios iniciais da inflamação. IL-1 β promove febre e letargia, enquanto IL-6 regula a maturação e ativação de neutrófilos e macrófagos, além de contribuir para a diferenciação e manutenção de linfócitos T citotóxicos e células natural killer (NK) (Duan et al., 2024; Yu et al., 2020). Subsequentemente, IL-2 estimula a ativação, crescimento e diferenciação das células T CD4⁺ e CD8⁺; IL-8 recruta e ativa neutrófilos; e IFN- γ estimula a ativação de macrófagos (Li et al., 2015; Pu et al., 2023; Arendt et al., 2019). O influxo de neutrófilos no epitélio intestinal causado pela IL-8 aumenta o dano tecidual e a secreção de fluidos, agravando a diarreia (Wigley e Kaiser, 2003). Finalmente, IL-10, TGF- β e CTLA-4 atuam como reguladores negativos da resposta imune. IL-10 inibe tanto a imunidade inata quanto a adaptativa ao suprimir a síntese de IL-1 β e IFN- γ , enquanto TGF- β e CTLA-4 regulam negativamente a ativação das células T efectoras (Wigley; Kaiser, 2003).

O painel de genes selecionados incluiu marcadores relacionados às junções de adesão para avaliar a integridade da barreira intestinal e os alvos de danos durante a invasão por *Eimeria* spp. Além disso, foram incluídas citocinas para analisar as interações dinâmicas entre as respostas pró e anti-inflamatórias nas células. Citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 e IFN- γ) foram selecionadas por seus papéis centrais em induzir e sustentar a resposta imune, recrutando células inflamatórias e mediando a inflamação no local da infecção. Em contraste, citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) e a molécula reguladora CTLA-4 foram incluídas para investigar mecanismos imunorregulatórios capazes de atenuar o dano tecidual e promover a restauração da homeostase. Este painel abrangente fornece um entendimento mais profundo de como a infecção por *Eimeria* compromete a função intestinal e modula a imunidade do hospedeiro, contribuindo assim para a interpretação dos padrões de expressão gênica durante a progressão da doença e a recuperação.

Assim, compreender a expressão gênica dos marcadores de saúde intestinal e das citocinas envolvidas na resposta inflamatória pode fornecer uma visão mais detalhada da infecção por *Eimeria* spp. no ceco de frangos de corte. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a dinâmica da expressão gênica de citocinas relacionadas à resposta imune, bem como de marcadores moleculares de saúde intestinal, em frangos de corte de diferentes idades desafiados com diferentes doses de *Eimeria* spp.

2. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleta de amostras e desafio de vacinal

Pintinhos de corte da linhagem Cobb-500 com um dia de idade foram desafiados por gavagem oral com a vacina Fortegra® (MSD Saúde Animal), que contém oocistos atenuados de *Eimeria tenella*, *E. acervulina* e *E. maxima*, logo após a chegada à instalação experimental. Os animais receberam doses 10 e 40 vezes maiores ao volume da dose recomendada. Para padronizar a dose infecciosa, os oocistos foram contados usando uma câmara de Neubauer para determinar o número de oocistos por unidade da dose da vacina. As doses inoculadas foram de $8,4 \times 10^6$ oocistos para o grupo 10× e $3,36 \times 10^7$ oocistos para o grupo 40×. Essas diferentes doses de vacina foram usadas para simular níveis variados de desafio com *Eimeria* spp.

Os frangos de corte foram alojados em gaiolas ($90 \times 45 \times 40$ cm) dispostas em gaiolas metálicas de três andares, com uma densidade aproximada de quatro aves por metro quadrado. Cada gaiola experimental foi equipada com um comedouro tipo calha de 90 cm e um bebedouro tipo copo. As gaiolas são dispostas em baterias metálicas de 3 andares, cada bateria com 12 gaiolas.

O aquecimento nas gaiolas metabólicas foi feito através de lâmpadas de cerâmica incandescentes e fornecimento *ad libitum* de ração e água. As condições climáticas (temperatura máxima e mínima e umidade relativa do ar) foram monitoradas durante todo o período experimental. As gaiolas foram colocadas dentro de um galpão avícola protegido por tela para impedir o acesso de outros animais, e o ambiente era climatizado com lâmpadas de aquecimento em dias frios e ventiladores em dias quentes. A dieta basal foi formulada conforme as exigências nutricionais recomendadas nas Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos (Rostagno et al., 2017), utilizando milho e farelo de soja como ingredientes base, não contendo produtos coccidiostáticos e coccidiocidas, nem aditivos antimicrobianos.

Após o desafio experimental, os animais foram divididos em três grupos: grupo controle (GC), composto por frangos desafiados com PBS 1× via administração oral; G1, composto por frangos desafiados com 10× a dose padrão da vacina; e G2, que incluiu frangos desafiados com 40× a dose padrão da vacina. Inicialmente, quatro frangos foram colocados em cada gaiola no início do experimento. Cada grupo (GC, G1 e G2) continha 24 frangos. Aos 7, 14 e 21 dias pós-vacinação, oito aves de cada grupo foram eutanasiadas por deslocamento cervical, seguindo as

diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), em conformidade com a Resolução Normativa 37/2018. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) (CEUA nº 1852071223). No momento da eutanásia, fragmentos de tecido cecal foram coletados, armazenados em tubos Eppendorf® contendo 500 µL de RNAlater (Thermo Fisher Scientific, CA, EUA) e mantidos congelados a -20°C até a extração do material genético.

5.2 Extração de DNA e RNA

O DNA foi extraído da vacina, e de fragmentos de tecido do duodeno, jejuno e ceco utilizando o método de fenol-clorofórmio descrito por Sambrook et al. (1989). Para a extração de RNA, os fragmentos de tecido cecal foram imediatamente preservados em 500 µL de RNAlater™ (Thermo Fisher Scientific) e armazenados a -80°C por até 4 semanas até a extração do RNA. As amostras foram descongeladas lentamente, lavadas duas vezes com água tratada com DEPC e incubadas com 500 µL de reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA). Em seguida, os microtubos foram imersos em nitrogênio líquido e o tecido cecal foi lisado mecanicamente utilizando um disruptor de tecidos L-BEADER 6 (Loccus Biotecnologia, Brasil). A amostra foi homogeneizada em três ciclos de 30 segundos, com intervalos de 1 minuto no gelo entre os ciclos para evitar a degradação do RNA, usando três microesferas de aço inoxidável. O tecido lisado foi então submetido à extração de RNA utilizando o kit PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), seguindo as instruções do fabricante. A pureza e concentração do DNA e RNA foram medidas utilizando um espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Inc.).

5.3 Ensaio molecular e curva padrão

As amostras de DNA extraído foram analisadas para detectar *E. tenella*, *E. acervulina* e *E. maxima* na vacina, duodeno, jejuno e ceco, seguindo o método descrito por Vrba et al. (2010). A reação foi realizada utilizando 1× TaqMan® Advanced Master Mix, 250 nM de sonda, 900 nM de primers forward e reverse, e 3 µL de DNA. A PCR em tempo real foi conduzida utilizando o sistema StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) sob as seguintes condições de ciclagem térmica: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos a 95°C por 20 segundos e 60°C por 1 minuto.

Para avaliar a linearidade e a sensibilidade analítica do protocolo de qPCR, diluições seriadas em dez vezes (variando de 10⁶ a 1 cópia) foram analisadas em triplicata para cada etapa de diluição, utilizando uma curva padrão gerada com o software SigmaPlot® versão 10.0

(Systat Software Inc., San Jose, Califórnia, EUA). A eficiência da reação foi determinada a partir do declive da curva padrão, usando a fórmula $[Eficiência = 10^{(-1/declive)} - 1]$ (Svec et al., 2015).

5.4 Síntese de cDNA e análise de expressão gênica

Um total de 500 ng de RNA foi submetido à transcrição reversa utilizando o kit High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (ThermoFisher Scientific, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A mistura da reação continha 1 µL de Enzyme Mix 20× (incluindo transcriptase reversa MuLV e inibidor de RNase), 4 µL de RT Buffer Mix 2× (incluindo dNTPs, octâmeros aleatórios e oligo dT-16) e 1 µg de RNA total (4 µL da amostra de RNA), em um volume final de 20 µL. As reações foram realizadas em um termociclador Veriti® (Thermo Fisher Scientific, EUA) sob as seguintes condições: 37°C por 60 minutos, seguido de 95°C por 5 minutos. Ensaio de qPCR foram utilizados para avaliar a expressão de citocinas e marcadores moleculares relacionados ao sistema imune e à saúde intestinal das aves (Tabela 1). As reações de qPCR foram realizadas em um sistema StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em volume final de 12 µL, contendo 1× FastStart SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems®), 400 nM de primers e 150 ng/µL da amostra (3 µL). As condições de ciclagem térmica foram 95°C por 20 segundos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e 60°C por 30 segundos, com análise de curva de dissociação (melting curve). A linha limiar (threshold) foi padronizada para o mesmo valor de baseline em todas as placas de qPCR.

Os níveis relativos de expressão gênica no grupo controle em comparação aos grupos de desafio 10× e 40× foram normalizados utilizando a média geométrica dos valores de Cq dos genes β -actina e GAPDH (Tabela 1). A estabilidade da expressão dos genes referenciais candidatos GAPDH e β -actina foi avaliada pelo algoritmo geNorm (Vandesompele et al., 2002). Genes com valor $M \leq 1,0$ e $CV < 40\%$ foram considerados suficientemente estáveis, de acordo com as diretrizes MIQE (Bustin et al., 2009). A expressão gênica foi calculada pelo método $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$ (Livak e Schmittgen, 2001).

Tabela 1. Sequências de primers utilizadas em qPCR para análise da expressão gênica de citocinas e marcadores moleculares do sistema imunológico e da saúde intestinal em amostras cecais de frangos de corte.

Gene	Sequencia	Referencia
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	F:CAACCCCAATGTCTCTGTT R: TCAGCAGCAGCCTTCACTAC	Barekatin et al. (2019)

Beta-actina	F:GCCAACAGAGAGAAGATGACAC R: GTAACACCATCACCAGAGTCCA	Pu et al. (2023)
Interleucina 1 beta	F:GGAGGTTTTTGAGCCCGTC R:TCGAAGATGTCTGAAGGACTG	Dunislawskaetal et al. (2017)
Interleucina 2	F:TTCATCTCGAGCTCTACACACCAA R:TGTCATCTTCAGTTTCTTTCTTCAGAG T	Pu et al. (2023)
Interleucina 6	F:AGGACGAGATGTGCAAGAAGTTC R:TTGGGCAGGTTGAGGTTGTT	Chiang et al. (2009)
Interleucina 8	F:CCGATGCCAGTGCATAGAGA R:GGTGTCTGCCTTGTCCAGAA	Rodríguez et al. (2023)
Interleucina 10	F:CTTTGGCTGCCAGTCTGTGTC R:GCTCTGCTGATGACTGGTGCT	Pu et al. (2023)
Cluster de Diferenciação 4	F:GGAGGAAGCTCATGTTTGGA R:CTGCCACCTCATACCAGTGA	Ingrao et al. (2018)
Cluster de Diferenciação 8	F:AGCTCAGAGCCAGGAACAAG R:GTCTTTTGGCAGAGCACGAT	Ingrao et al. (2018)
Antígeno 4 de linfócitos T citotóxicos	F:CAAGATGGAGCGGATGTACC R:TGGCTGAGATGATGATGCTG	Pu et al. (2023)
Fator de Crescimento Transformador Beta	F:GCCGACACGCAGTACACCAA R:TGCAGGCACGGACCACCAT	Pu et al. (2023)
Interferon Gamma	F:ATCATACTGAGCCAGATTGTTTCG R:TCTTTCACCTTCTTCACGCCAT	Pu et al. (2023)
Claudina C	F:GCCAAGATCACCATCGTCTC R:CACCAGCGGGTTGTAGAAAT	Barekatin et al. (2019)
Zonula Oclusão-1	F:CCGCAGTCGTTACGATCT R:GGAGAATGTCTGGAATGGTCTGA	Barekatin et al. (2019)
Zonula Oclusão-2	F:GCCCAGCAGATGGATTACTT R:TGGCCACTTTTCCACTTTTC	Barekatin et al. (2019)
Molécula de Junção de Adesão	F:AGACAGGAACAGGCAGTGCT R:TCCAATCCCATTGAGGCTA	Barekatin et al. (2019)
Ocludina	F:ACGGCAAAGCCAACATCTAC R:ATCCGCCACGTTCTTCAC	Barekatin et al. (2019)

F: Forward; R: Reverse.

5.5 Análise estatística

A expressão gênica dos marcadores de saúde intestinal e das citocinas pró e anti-inflamatórias foi analisada comparando as doses 10× e 40× em frangos da mesma faixa etária. Adicionalmente, a expressão gênica foi avaliada para investigar o efeito da idade dos frangos na mesma dose de desafio com *Eimeria* spp. Em ambos os casos, a normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os valores de expressão gênica foram normalizados em relação à idade e à dose usando calibradores de tratamento diferentes, resultando em escalas relativas de expressão que não são comparáveis entre si. Devido a essa estrutura independente de normalização gênica, foi realizado ANOVA unidirecional, e a interação entre dose e idade não foi avaliada neste estudo. Para os valores delta Cq que apresentaram distribuição normal, foi realizada ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey, com nível de significância de 95%. Para os valores delta Cq que não apresentaram distribuição normal, foi aplicado o teste

de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn, considerando nível de significância de 95%.

3. RESULTADOS

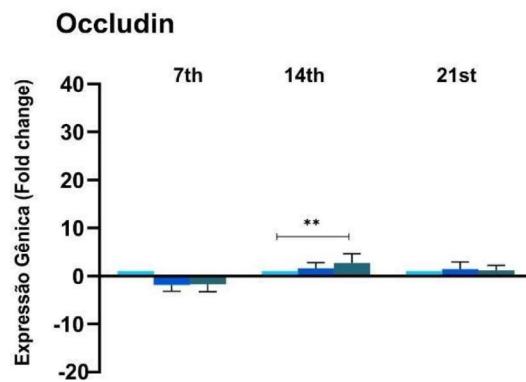
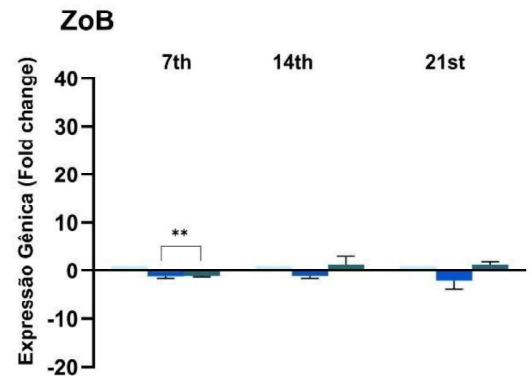
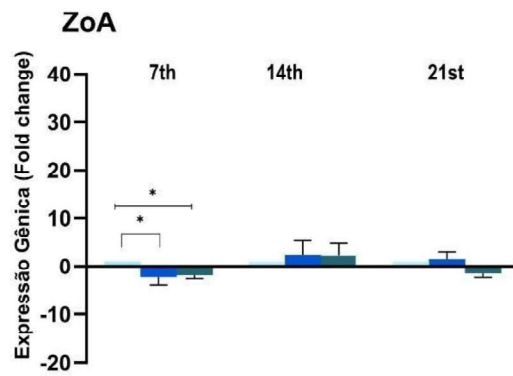
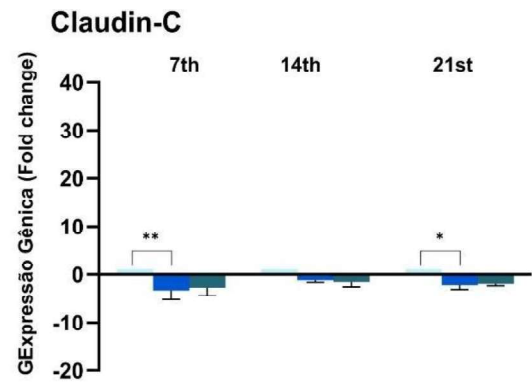
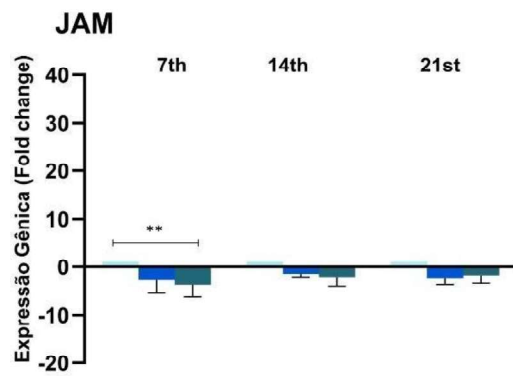
6.1 Detecção de *Eimeria* spp. no ceco de frangos

Os ensaios moleculares demonstraram eficiências de 95,78% para *E. acervulina*, 95,37% para *E. maxima* e 96,65% para *E. tenella*. A presença das três espécies de *Eimeria* (*E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*) na vacina foi confirmada por qPCR. *Eimeria acervulina* e *E. maxima* foram detectadas por qPCR no duodeno e jejuno dos animais desafiados. Todos os fragmentos de tecido cecal analisados neste estudo de animais desafiados com 10× (G1) e 40× (G2) foram positivos para detecção por qPCR de *E. tenella* e negativos para *E. acervulina* e *E. maxima*. Nenhuma espécie de *Eimeria* foi detectada no grupo controle.

6.2 Expressão dos genes de saúde intestinal em função da dose de desafio

No sétimo dia após a infecção, a expressão dos genes JAM, ZO-A e claudin-C foi reduzida. No grupo G1, o gene ZO-A foi significativamente regulado para baixo ($p = 0,0032$), com níveis de expressão 2,32 vezes menores, enquanto o gene transmembranar claudin-C foi 3,26 vezes menos expresso em relação ao controle ($p = 0,0071$). No grupo G2, o gene JAM foi significativamente regulado para baixo, com níveis de expressão 3,62 vezes menores que no grupo controle ($p = 0,0043$) (Figura 1). Além disso, a expressão de ZO-A foi regulada para baixo em 1,92 vezes no G2 em comparação com o grupo controle ($p = 0,0356$) (Figura 1).

No 14º dia pós-infecção, o grupo G2 apresentou aumento significativo na expressão do gene occludina, que foi 2,72 vezes maior que no grupo controle ($p = 0,0019$) (Figura 1). No vigésimo primeiro dia, a expressão do gene claudin-C no G1 foi significativamente regulada para baixo, com níveis 2,18 vezes menores do que os observados no grupo controle ($p = 0,0193$) (Figura 1).



● Controle ● G1 ● G2

Figura 1. Níveis relativos de expressão gênica das proteínas de junção estreita (TJ) — JAM, claudina-C, ZO-A, ZO-B e ocludina — no ceco de frangos de corte desafiados com *Eimeria* spp. em doses vacinais de 10× (G1) e 40× (G2), comparados ao grupo controle. Os dados são apresentados como média ± erro padrão. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estão indicadas por asteriscos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), com linhas horizontais marcando as comparações.

6.3 Expressão dos genes de saúde intestinal em função da idade

No grupo G1, os genes JAM, ZO-A, occludina e claudin-C mantiveram expressão relativamente estável de mRNA ($p > 0,05$) aos 14 e 21 dias pós-infecção. A expressão do gene occludina foi regulada para cima, exibindo um aumento de 2,06 vezes aos 14 dias de idade ($p = 0,0249$), com diferença significativa observada entre os dias 14 e 21 ($p = 0,0152$) (Figura 2). No grupo G2 (desafio vacinal 40×), a expressão do gene ZO-A diminuiu significativamente, apresentando níveis duas vezes menores aos 21 dias de idade ($p = 0,0013$). A expressão do gene ZO-B também apresentou uma tendência de redução, com expressão 1,46 vezes menor aos 14 dias de idade em comparação com os 7 dias, e essa redução foi mantida aos 21 dias de idade (Figura 2).

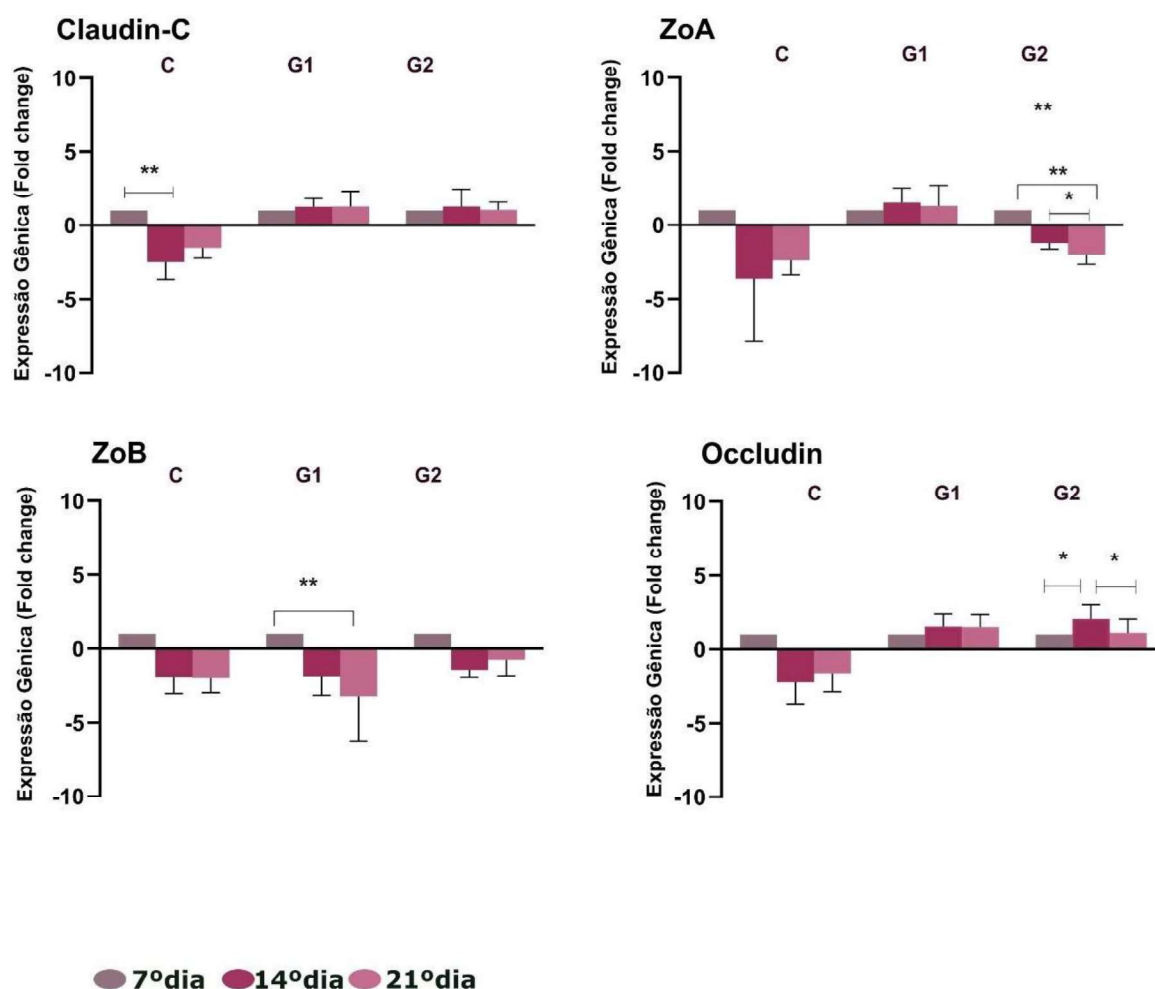


Figura 2. Níveis de expressão gênica de marcadores de saúde intestinal (claudina-C, ZO-A, ZO-B, JAM e ocludina) avaliados aos 14 e 21 dias, em resposta a doses de 10× e 40× de *Eimeria* spp. Os níveis de expressão gênica foram calculados em função da idade dos frangos de corte, utilizando aves com 7 dias de idade como tratamento calibrador. O efeito da dose de *Eimeria* spp. foi avaliado em cada idade, comparando-se as variações na expressão gênica aos 14 e 21 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estão indicadas por asteriscos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), com linhas horizontais marcando as comparações.

6.4 Expressão gênica de citocinas em função da dose de desafio

No sétimo dia após infecção, a expressão do gene da citocina IL1 β foi significativamente reduzida em ambos os grupos, sendo 13,37 vezes menor que no controle em G1 ($p = 0,0011$) e 7,98 vezes menor em G2 ($p = 0,0175$) (Figura 3). Enquanto isso, a expressão do gene IL2 foi significativamente aumentada, sendo 6,72 vezes maior em G1 ($p = 0,0024$) e 12,94 vezes maior em G2 ($p < 0,0001$) que no controle. Os níveis de IFN- γ foram elevados,

mostrando um aumento de 9,27 vezes em G1 ($p < 0,0001$) e 30,82 vezes em G2 ($p < 0,0001$), demonstrando uma resposta inflamatória robusta imediatamente após o desafio.

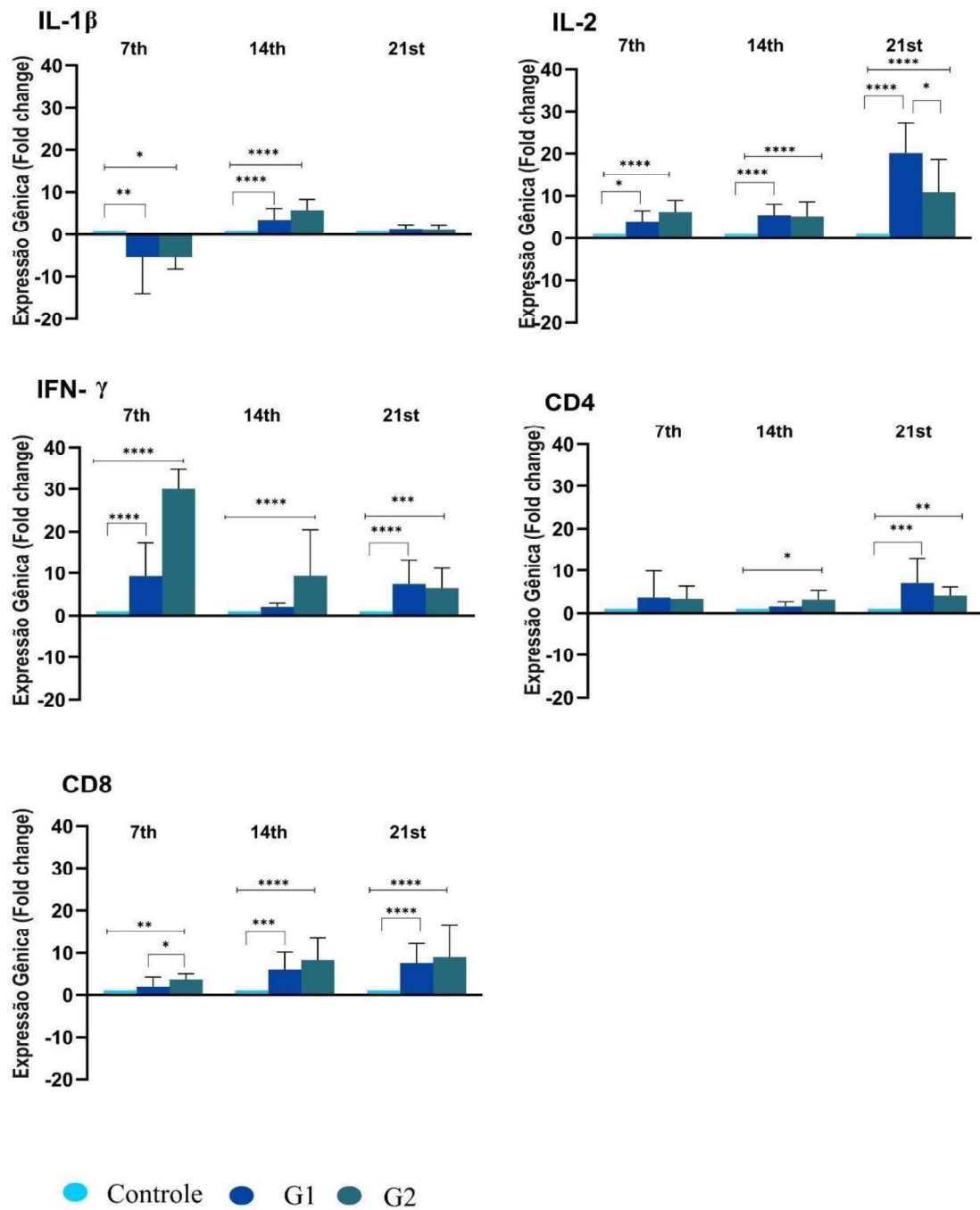


Figura 3. Níveis relativos de expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (IL1 β , IL2, IL6, IL8 e IFN- γ) e marcadores de linfócitos T (genes CD4 e CD8) no ceco de frangos de corte desafiados com *Eimeria* spp. nas doses vacinais de 10 $\times$ (G1) e 40 $\times$ (G2), em comparação ao grupo controle. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estão indicadas por asteriscos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$), com linhas horizontais indicando as comparações.

Quanto aos linfócitos T, a expressão do gene CD4 não apresentou mudanças significativas, enquanto a expressão do gene CD8 em G2 foi significativamente aumentada, sendo 3,82 vezes maior que no controle ($p = 0,0050$) (Figura 3). Entre as citocinas reguladoras, IL10 não apresentou diferença em G1; no entanto, em G2, foi significativamente aumentada, sendo 6,49 vezes maior ($p = 0,0003$). Para TGF- β , G2 apresentou aumento na expressão, com níveis 2,57 vezes maiores que o controle ($p = 0,0063$). De forma semelhante, CTLA-4 foi regulado para cima em G2, com níveis de expressão 2,62 vezes maiores que no controle ($p = 0,033$) (Figura 4).

No décimo quarto dia, a expressão de IL1 β foi significativamente aumentada, alcançando níveis 8,26 vezes maiores em G1 ($p < 0,0001$) e 9,40 vezes maiores em G2 ($p < 0,001$) comparado ao controle, marcando o pico da resposta inflamatória. De forma semelhante, a expressão do gene IL2 foi significativamente elevada, sendo 5,51 vezes maior em G1 e 5,22 vezes maior em G2 ($p < 0,0001$) que o controle (Figura 3). Os níveis de expressão do gene IFN- γ não diferiram significativamente em G1, mas em G2 foram aumentados, apresentando um aumento de 10,41 vezes em relação ao controle ($p < 0,0001$) (Figura 4).

No vigésimo primeiro dia pós-infecção Os níveis de expressão de IL2 foram significativamente aumentados, sendo 20,78 vezes maiores em G1 ($p < 0,0001$) e 12,53 vezes maiores em G2 ($p < 0,0001$), com diferença significativa entre as doses ($p = 0,0170$) (Figura. 3). A expressão do gene IFN- γ permaneceu aumentada, sendo 7,40 vezes maior que no grupo controle em G1 ($p < 0,0001$) e 6,48 vezes maior em G2 ($p = 0,001$) (Figura 4).

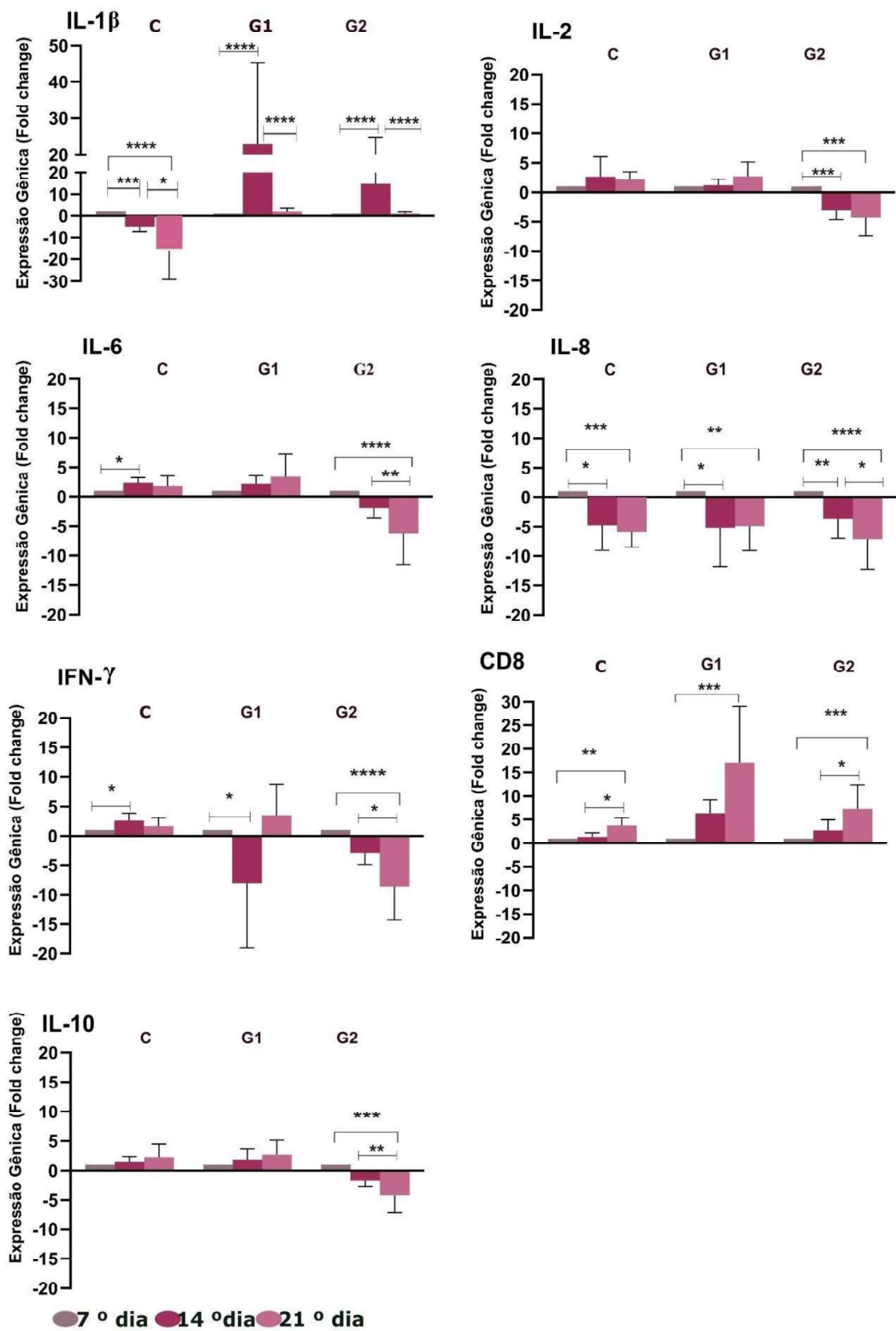


Figura 4. Níveis relativos de expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (IL1 β , IL2, IL6, IL8 e IFN- γ), anti-inflamatória (IL10) e do marcador de linfócitos T (gene CD8), avaliados aos 14 e 21 dias em resposta às doses de 10 $\times$ e 40 $\times$ de *Eimeria* spp. Os níveis de

expressão gênica foram calculados em função da idade dos frangos de corte, utilizando frangos com 7 dias de idade como tratamento calibrador. O efeito da dose de *Eimeria* spp. foi avaliado em cada idade, comparando-se as variações na expressão gênica entre 14 e 21 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estão indicadas por asteriscos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$), com linhas horizontais indicando as comparações.

6.5 Expressão gênica de citocinas em função da idade

No grupo G1, o gene IL1 β foi significativamente regulado para cima no 14º dia, com um aumento de 22,94 vezes em comparação ao 7º dia ($p < 0,0001$). Contudo, no 21º dia, sua expressão foi regulada para baixo em 1,90 vezes, aproximando-se dos níveis basais. O gene IL6 apresentou uma modesta regulação para cima no 14º dia (2,17 vezes, $p > 0,05$), enquanto o gene IL8, associado às respostas inflamatórias iniciais, apresentou regulação negativa de -5,19 vezes no 14º dia e -4,87 vezes no 21º dia ($p < 0,01$), sugerindo uma possível regulação negativa na fase tardia da infecção (Figura 4). Além disso, a expressão do gene CD8 foi significativamente regulada para cima no 21º dia, alcançando um aumento de 17,33 vezes em relação ao 7º dia ($p < 0,001$), sugerindo um papel potencial da resposta citotóxica na imunidade contra *Eimeria* spp. No 14º dia, a expressão do gene IFN- γ foi fortemente regulada para baixo, com uma redução de 8,02 vezes em relação ao 7º dia ($p < 0,05$). No 21º dia, a expressão do IFN- γ mostrou recuperação parcial e foi regulada para cima em 3,50 vezes em comparação ao 7º dia ($p > 0,05$) (Figura 4).

No grupo G2, o gene IL1 β também foi regulado para cima no 14º dia, embora em menor intensidade que no grupo G1, alcançando um aumento de 14,67 vezes em relação ao 7º dia ($p < 0,0001$). Contudo, no 21º dia, a expressão do gene IL1 β foi ainda mais regulada para baixo, caindo para 1,03 vez, indicando um retorno completo aos níveis basais. No 21º dia, a expressão do gene IL6 foi regulada para baixo, atingindo -6,19 vezes em relação ao 7º dia ($p < 0,01$). Os genes IL8 e IL2 apresentaram regulação progressiva para baixo, com IL8 diminuindo -3,64 vezes no 14º dia e -7,08 vezes no 21º dia ($p < 0,0001$), enquanto o gene IL2 foi regulado para baixo em -3,22 vezes no 14º dia e -3,99 vezes no 21º dia ($p < 0,001$) (Figura 4). No 21º dia, a expressão do gene IL10 foi regulada para baixo em -4,21 vezes ($p < 0,001$), indicando uma resposta anti-inflamatória enfraquecida, enquanto o gene IFN- γ foi negativamente regulado em -8,57 vezes ($p < 0,0001$), sugerindo severo comprometimento da resposta imune mediada por Th1 (Figuras 4 e 5). Em contraste, a expressão do gene CD8 foi significativamente regulada para cima, com aumento de 7,36 vezes ($p < 0,001$) (Figura 4).

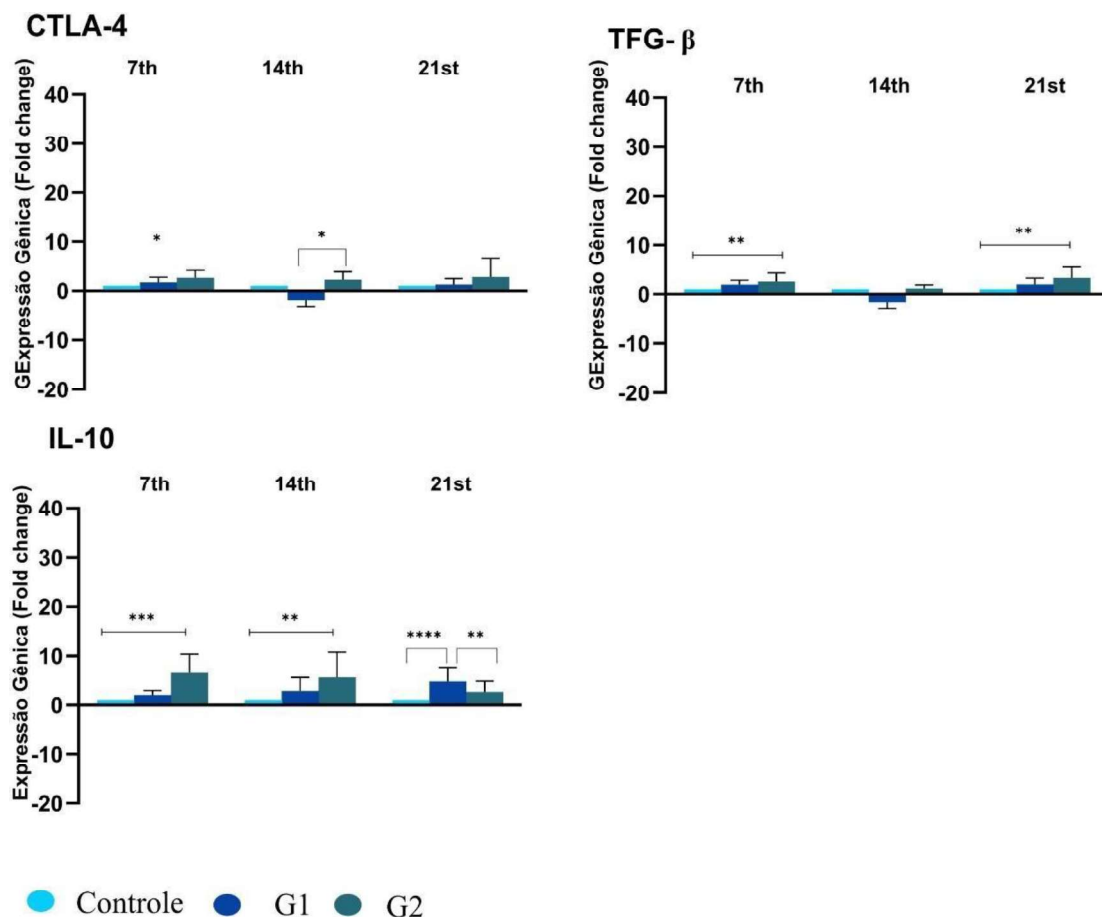


Figura 5. Níveis relativos de expressão gênica de citocinas anti-inflamatórias (CTLA-4, TGF- β e IL10) no ceco de frangos de corte desafiados com *Eimeria* spp. nas doses de 10 $\times$ (G1) e 40 $\times$ (G2), em comparação ao grupo controle. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estão indicadas por asteriscos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$), com linhas horizontais indicando as comparações.

4. DISCUSSÃO

Parasitas do gênero *Eimeria* invadem o epitélio intestinal e causam ruptura das estruturas e membranas celulares, resultando em lesões que variam em gravidade dependendo da espécie e da carga parasitária. Quanto maior a carga parasitária, maior o dano ao tecido intestinal e mais intensa a ativação do sistema imunológico, que inclui a produção de citocinas e o recrutamento de células imunes ao local da infecção (Cheng et al., 2019; López-Osorio et al., 2020;). Diferentes estratégias para mitigar os danos causados pela coccidiose e os efeitos de *Eimeria* spp. nos organismos hospedeiros têm sido foco de diversos estudos (Soutter et al., 2020; Bremner et al., 2021; Gaghan et al., 2022; El-Shall et al., 2022; Nouri, 2024).

A expressão anormal de genes relacionados às junções de adesão no epitélio intestinal está associada à diminuição da função da barreira intestinal e ao aumento da permeabilidade intestinal, estando diretamente relacionada ao ciclo de vida de *Eimeria* spp. (Xu et al., 2016). A fase endógena do ciclo do parasita é caracterizada por múltiplas rodadas de replicação do DNA e mitose dentro do endotélio (Marugan-Hernandez et al., 2020). Além disso, segundo Shao et al. (2013), 14 dias após a infecção (dpi) com *Salmonella Typhimurium*, o jejuno de frangos apresentou diminuição na expressão gênica de marcadores de saúde intestinal, resultando em aumento da permeabilidade paracelular e rompimento da barreira intestinal, permitindo a difusão de macromoléculas e seu reconhecimento pelo sistema imune.

De acordo, este estudo observou regulação negativa da expressão do gene claudin-C em G1, JAM em G2, e ZO-A em ambos G1 e G2 no 7º dia após o desafio, confirmando os resultados de estudos anteriores. De forma similar a este estudo, Criado-Mesas et al. (2021) descreveram a regulação negativa do gene claudin-C. Entretanto, em contraste com nossos achados, este estudo relatou aumento da expressão do gene JAM ao examinar o íleo de frangos de 15 dias seis dias após o desafio com *Eimeria* spp. Quando oócistos de *E. tenella* foram inoculados em frangos de 14 dias, Zhou et al. (2023) observaram altos níveis de expressão gênica dos genes que codificam ZO e claudinas três dias após a infecção, enquanto a expressão do gene occludina permaneceu similar ao grupo controle. O aumento na expressão dos genes relacionados à saúde intestinal pode estar associado a um processo de remodelamento tecidual, seguido pela estabilização dos níveis de expressão. Esse padrão foi observado no presente estudo, em que a expressão do gene occludina aumentou significativamente apenas no 14º dia no grupo desafiado com a maior dose de oócistos, retornando aos níveis do controle no 21º dia, sugerindo um mecanismo compensatório transitório.

Neste estudo, tanto a dose do desafio com *Eimeria* spp. quanto a idade dos frangos afetaram de forma diferenciada a expressão dos genes relacionados à integridade intestinal. O

grupo G2 apresentou variações marcantes na expressão gênica para marcadores específicos ao longo do tempo, enquanto o grupo G1 apresentou uma resposta mais estável, exceto para o gene ZO-B, que foi significativamente regulado para baixo no último dia da análise. Esses resultados ressaltam a importância de considerar tanto o nível de desafio parasitário quanto o estágio de desenvolvimento dos frangos para compreender os mecanismos que regulam a saúde intestinal na produção avícola.

As diferenças nos resultados de expressão relacionados à saúde intestinal podem estar relacionadas à especificidade dos tecidos analisados, às diferentes espécies de *Eimeria*, aos dias de inoculação e ao ciclo de vida do patógeno. Além disso, a regulação prolongada dos genes ZO-A e ZO-B no grupo G2 sugere uma ruptura mais severa da integridade epitelial com alta carga parasitária, que poderia comprometer a homeostase intestinal por um período estendido. Embora esses genes de citocinas não sejam altamente expressos no ceco, a integridade do epitélio cecal é extremamente importante para a homeostase intestinal.

A resposta imune do hospedeiro à infecção por *Eimeria* spp. é complexa e envolve vários mediadores da resposta pró-inflamatória (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8 e IFN- γ), imunidade celular (linfócitos CD4 e CD8) e resposta anti-inflamatória (IL-10 e CTLA-4), além do TGF- β , que possui funções regulatórias e inflamatórias (Tomal et al., 2023). A expressão do gene IL1 β é regulada para cima em resposta a desafios parasitários e é rapidamente induzida devido ao seu papel como mediador pró-inflamatório (Gibson et al., 2014). Baseado em Laurent et al. (2001), o gene IL1 β é regulado para cima no ceco de frangos de 21 dias infectados com oócistos de *E. tenella* sete dias após a infecção. O aumento da expressão gênica de IL1 β observado apenas no 14º dia para ambas as doses neste estudo pode ser explicado pelo uso de oócistos atenuados, que passam por menos ciclos de merogonia (Shirley, 1994). Esse pico retardado na expressão de IL1 β sugere uma ativação imune mais lenta em comparação com cepas virulentas, possivelmente contribuindo para a redução da inflamação tecidual no início da infecção.

Durante a fase pró-inflamatória, o gene IL2, uma citocina essencial para a modulação do sistema imune, foi relatado por Yu et al. (2021) como regulado para cima entre os dias 6 e 8 pós-infecção em frangos de 18 dias desafiados com suspensão oral de $2,5 \times 10^4$ oócistos esporulados de *E. tenella*. Nossos resultados corroboram essa observação, mostrando expressão gênica aumentada dessa interleucina em todos os dias analisados. Contudo, na dose de desafio

mais alta, observou-se regulação progressiva para baixo ao longo do tempo, destacando a importância da resposta imune celular nas infecções por *Eimeria* spp.

A importância do IL6 e do IL8 na fase inicial da resposta imune foi enfatizada por Yu et al. (2020), que observaram aumento na expressão desses genes de citocinas em amostras cecais de frangos desafiados com oócistos de *E. tenella*. De forma semelhante, Attia et al. (2023) relataram aumento de 3 e 8 vezes na expressão gênica de IL6 e IL8, respectivamente, entre os dias 0 e 4 pós-infecção, seguido por regulação negativa no dia 12 em pintinhos de 14 dias infectados com *E. tenella* ($2,5 \times 10^4$ oócistos esporulados). Contudo, no presente estudo, a expressão gênica do IL8 foi significativamente regulada para baixo no grupo G2 nos dias 14 e 21, sugerindo que a infecção em alta dose pode suprimir o recrutamento de neutrófilos, levando potencialmente a respostas inflamatórias iniciais reduzidas e aumento da suscetibilidade a infecções secundárias.

Além disso, a regulação negativa simultânea dos genes IFN- γ e IL10 no grupo G2 no 21º dia sugere um efeito profundo de supressão imune em altas cargas parasitárias. O IFN- γ desempenha papel crucial na resistência a protozoários intracelulares, enquanto a IL-10 ajuda a regular a inflamação excessiva. A regulação negativa simultânea indica um desequilíbrio na homeostase imune, que pode comprometer tanto a eliminação do patógeno quanto o controle da inflamação, aumentando a severidade da doença.

Este estudo utilizou uma vacina mista no desafio experimental, e as evidências indicaram que os resultados foram principalmente devido à infecção por *E. tenella* (Cornelissen et al., 2009), devido ao seu tropismo específico para o ceco, órgão estudado no artigo, e por ser a espécie mais patogênica e causadora das maiores perdas na produção. Contudo, a presença de outras espécies de *Eimeria* na região não pode ser completamente descartada, mesmo em níveis extremamente baixos de significância. Dado o alto poder de detecção do qPCR, é teoricamente possível detectar uma única cópia de DNA de outras espécies. Assim, a ausência de detecção neste estudo pode refletir concentrações abaixo do limite mínimo detectável do ensaio. Portanto, embora os dados indiquem fortemente que os achados locais estão relacionados à infecção por *E. tenella*, a possibilidade de infecção mista em níveis subclínicos ou com carga parasitária abaixo do limite de detecção não pode ser completamente descartada. Por essa razão, a análise de outros segmentos intestinais poderia ampliar a compreensão das respostas imunes sistêmicas, mas neste estudo focamos no que ocorre no ceco devido ao seu papel fundamental na fermentação de fibras, absorção de água e regulação da microbiota em frangos. Acreditamos que ele desempenha papel chave na resposta imune local, pois é o sítio da infecção por *E. tenella*. Além disso, a ausência de parâmetros zootécnicos, como ganho de

peso e conversão alimentar, limita a correlação entre os achados moleculares e os efeitos clínicos da infecção. Essas limitações devem ser abordadas em estudos futuros.

Assim, este estudo demonstrou que a expressão gênica dos marcadores de resposta imune e saúde intestinal em frangos de um dia desafiados com *Eimeria* spp. variou com a dose de desafio e o tempo após a infecção. Citocinas pró-inflamatórias, como IL1 β , IL2 e IFN- γ , mostraram padrões distintos de expressão gênica com picos no 14º dia, enquanto IL10 e CTLA-4 sugeriram um papel modulador na resposta imune. A regulação progressiva para baixo de IL8 e IL2 no grupo G2 destaca um possível efeito de supressão imune em altas doses de infecção, que pode prejudicar a eliminação do patógeno e prolongar o período de recuperação. Os marcadores de saúde intestinal apresentaram variações limitadas, com expressão reduzida de ZO-A, JAM e claudin-C, especialmente no 7º dia. Uma carga parasitária maior resultou em uma resposta imune mais intensa, sugerindo que a modulação da expressão gênica está diretamente relacionada à dose do desafio. Esses resultados reafirmam a importância de compreender os mecanismos imunológicos subjacentes à coccidiose aviária e contribuem para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle.

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo evidenciam que a expressão gênica dos marcadores relacionados à resposta imune e à integridade intestinal em frangos desafiados com *Eimeria* spp. é influenciada tanto pela dose do desafio quanto pelo tempo pós-infecção.

A carga parasitária mais elevada promoveu respostas imunes mais intensas e prolongadas, refletidas na modulação diferencial de citocinas pró- e anti-inflamatórias, bem como na regulação dos genes envolvidos nas junções de adesão do epitélio intestinal. A resposta imune mostrou um padrão dinâmico, com picos de expressão de mediadores pró-inflamatórios, seguidos por mecanismos moduladores que indicam a tentativa de controlar a inflamação e restaurar a homeostase intestinal. Além disso, a maior carga parasitária sugeriu supressão do sistema imune progressivamente, podendo comprometer a eliminação eficiente do patógeno e prolongar a recuperação do tecido intestinal.

Por fim, este trabalho reforça a importância de considerar a dose infecciosa e o estágio de desenvolvimento do hospedeiro ao investigar os mecanismos imunopatológicos da coccidiose em aves, contribuindo para o aprimoramento das estratégias de controle e manejo da doença na avicultura.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alam, M.Z., Dey, A.R., Rony, S.A., Parvin, S., Akter, S., 2022. Phylogenetic analysis of *Eimeria tenella* isolated from the litter of different chicken farms in Mymensingh, Bangladesh. *Vet. Med. Sci.* 8, 1563–1569. <https://doi.org/10.1002/vms3.799>.
- Al-Sadi, R., Boivin, M., Ma, T., 2009. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. *Front. Biosci.* 14, 2765–2784. <https://doi.org/10.2741/3413>.
- Arendt, M., Elissa, J., Schmidt, N., Michael, E., Potter, N., Cook, M., Knoll, L.J., 2019. Investigating the role of interleukin 10 on *Eimeria* intestinal pathogenesis in broiler chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 218, 109934. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.109934>.
- Attia, M.M., Mohamed, R.I., Salem, H.M., 2023. Impact of *Eimeria tenella* experimental infection on intestinal and splenic reaction of broiler chickens. *J. Parasite Dis.* 47, 829–836. <https://doi.org/10.1007/s12639-023-01629-z>.
- Barekatain, R., Chrystal, P.V., Howarth, G.S., McLaughlan, C.J., Gilani, S., Nattrass, G.S., 2019. Performance, intestinal permeability, and gene expression of selected tight junction proteins in broiler chickens fed reduced protein diets supplemented with arginine, glutamine, and glycine subjected to a leaky gut model. *Poult. Sci.* 98, 6761–6771. <https://doi.org/10.3382/ps/pez393>.
- Blake, D.P., Clark, E.L., Macdonald, S.E., Thenmozhi, V., Kundu, K., Garg, R., et al., 2015. Population, genetic, and antigenic diversity of the apicomplexan *Eimeria tenella* and their relevance to vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, E5343–E5350. <https://doi.org/10.1073/pnas.1506468112>.
- Blake, D.P., Tomley, F.M., 2014. Protecting poultry production from the ever-present challenge of *Eimeria*. *Trends Parasitol.* 30, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.10.003>.
- Bremner, A., Kim, S., Morris, K.M., Nolan, M.J., Borowska, D., Wu, Z., Tomley, F., Blake, D.P., Hawken, R., Kaiser, P., Vervelde, L., 2021. Kinetics of the cellular and transcriptomic response to *Eimeria maxima* in relatively resistant and susceptible chicken lines. *Front. Immunol.* 12, 653085. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.653085>.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- Cheng, Y.F., Chen, Y.P., Chen, R., et al., 2019. Dietary mannan oligosaccharide ameliorates

- cyclic heat stress-induced damages on intestinal oxidative status and barrier integrity of broilers. *Poult. Sci.* 98, 4767–4776. <https://doi.org/10.3382/ps/pez192>.
- Chiang, H.I., Berghman, L.R., Zhou, H., 2009. Inhibition of NF- κ B 1 (NF- κ Bp50) by RNA interference in chicken macrophage HD11 cell line challenged with *Salmonella enteritidis*. *Genet Mol. Biol.* 32, 507–515. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572009000300013>.
- Cornelissen, J.B.W.J., Swinkels, W.J.C., Boersma, W.A., Rebel, J.M.J., 2009. Host response to simultaneous infections with *Eimeria acervulina*, *maxima*, and *tenella*: a cumulation of single responses. *Vet. Parasitol.* 162, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.02.001>.
- Criado-Mesas, L., Abdelli, N., Noce, A., Farr´e, M., P´erez, J.F., Sol´a-Oriol, D., Martin-Venegas, R., Forouzandeh, A., Gonz´alez-Sol´e, F., Folch, J.M., 2021. Transversal gene expression panel to evaluate intestinal health in broiler chickens in different challenging conditions. *Sci. Rep.* 11, 6315. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85872-5>.
- Dunislawska, A., Slawinska, A., Stadnicka, K., Bednarczyk, M., Gulewicz, P., Jozefiak, D., 2017. Synbiotics for broiler chickens—*in vitro* design and evaluation of the influence on host and selected microbiota populations following *in ovo* delivery. *PLoS One* 12, e0168587. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168587>.
- Duan, C., Abudurehman, T., Wang, S., Suo, J., Yu, Y., Shi, F., Liu, X., Salama, D.B., Srivastav, R.K., Gupta, N., Suo, X., 2024. Expression of IL-1 β in transgenic *Eimeria necatrix* enhances the immunogenicity of parasites and promotes mucosal immunity against coccidiosis. *Front. Immunol.* 15, 1435702. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1435702>.
- El-Shall, N.A., Abd El-Hack, M.E., Albaqami, N.M., Khafaga, A.F., Taha, A.E., Swelum, A. A., El-Saadony, M.T., Salem, H.M., El-Tahan, A.M., AbuQamar, S.F., El-Tarabily, K. A., Elbestawy, A.R., 2022. Phytochemical control of poultry coccidiosis: a review. *Poult. Sci.* 101, 101542. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101542>.
- Gaghan, C., Adams, D., Mohammed, J., Crespo, R., Livingston, K., Kulkarni, R.R., 2022. Characterization of vaccine-induced immune responses against coccidiosis in broiler chickens. *Vaccine* 40, 3893–3902. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.05.043>.
- Gibson, M.S., Kaiser, P., Fife, M., 2014. The chicken IL-1 family: evolution in the context of the studied vertebrate lineage. *Immunogenetics* 66, 427–438. <https://doi.org/10.1007/s00251-014-0780-7>.
- Hu, C.A., Hou, Y., Yi, D., Qiu, Y., Wu, G., Kong, X., Yin, Y., 2015. Autophagy and tight

- junction proteins in the intestine and intestinal diseases. *Anim. Nutr.* 1, 123–127. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2015.08.014>.
- Huang, G., Tang, X., Bi, F., Hao, Z., Han, Z., Suo, J., Zhang, S., Wang, S., Duan, C., Yu, Z., Yu, F., Yu, Y., Lv, Y., Suo, X., Liu, X., 2018. *Eimeria tenella* infection perturbs the chicken gut microbiota from the onset of oocyst shedding. *Vet. Parasitol.* 258, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.06.005>.
- Ingrao, F., Rauw, F., Steensels, M., Van den Berg, T., Lambrecht, B., 2018. Early immune responses and profiling of cell-mediated immunity-associated gene expression in response to rHVT-IBD vaccination. *Vaccine* 36, 615–623. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.12.059>.
- Kaminsky, L.W., Al-Sadi, R., Ma, T.Y., 2021. IL-1 β and the intestinal epithelial tight junction barrier. *Front. Immunol.* 12, 767456. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.767456>.
- Laurent, F., Mancassola, R., Lacroix, S., Menezes, R., Naciri, M., 2001. Analysis of chicken mucosal immune response to *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* infection by quantitative reverse transcription-PCR. *Infect. Immun.* 69 (4). <https://doi.org/10.1128/iai.69.4.2527-2534.2001>.
- Li, Z., Tang, X., Suo, J., Qin, M., Yin, G., Liu, X., Suo, X., 2015. Transgenic *Eimeria mitis* expressing chicken interleukin 2 stimulated higher cellular immune response in chickens compared with the wild-type parasites. *Front. Microbiol.* 6, 533. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00533>.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- L'opez-Osorio, S., Chaparro-Gutiérrez, J.J., Gómez-Osorio, L.M., 2020. Overview of poultry *Eimeria* life cycle and host-parasite interactions. *Front. Vet. Sci.* 7, 384. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00384>.
- Macdonald, S.E., Nolan, M.J., Harman, K., Boulton, K., Hume, D.A., Tomley, F.M., Stabler, R.A., Blake, D.P., 2017. Effects of *Eimeria tenella* infection on chicken caecal microbiome diversity, exploring variation associated with severity of pathology. *PLoS One* 12, e0184890. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184890>.
- Marugan-Hernandez, V., Jeremiah, G., Aguiar-Martins, K., Burrell, A., Vaughan, S., Xia, D., Randle, N., Tomley, F., 2020. The growth of *Eimeria tenella*: characterization and

- application of quantitative methods to assess sporozoite invasion and endogenous development in cell culture. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 579833. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.579833>.
- Nawab, A., An, L., Wu, J., Li, G., Liu, W., Zhao, Y., Wu, Q., Xiao, M., 2019. Chicken toll-like receptors and their significance in immune response and disease resistance. *Int. Rev. Immunol.* 38, 284–306. <https://doi.org/10.1080/08830185.2019.1659258>.
- Nouri, A., 2024. Age-dependent development trends (models) of intestinal significant microbiota species and *Eimeria* oocysts in coccidia-challenged broiler chickens as affected by dietary encapsulated organic acids and anticoccidial drugs. *Avian Pathol.* 53, 264–284. <https://doi.org/10.1080/03079457.2024.2319284>.
- Pu, X., Pan, Y., Xiang, Q., Lu, M., Xu, L., Yan, R., Li, X., Song, X., 2023. Inhibitory effect of *Eimeria maxima* IFN- γ inhibitory molecules on the immune function of T cell subsets in chickens. *Poult. Sci.* 102, 103098. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103098>.
- Rodríguez, S.P., Herrera, A.L., Parra, J.E., 2023. Gene expression of pro-inflammatory (IL-8, IL-18, TNF- α , and IFN- γ) and anti-inflammatory (IL-10) cytokines in the duodenum of broiler chickens exposed to lipopolysaccharides from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Vet. World* 16, 564–570. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.564-570>.
- Rostagno, Horácio Santiago et al. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 4ta edição. Viçosa, MG: Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa. 488p, 2017.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. vol. 1.
- Shao, Y., Guo, Y., Wang, Z., 2013. β -1,3/1,6-Glucan alleviated intestinal mucosal barrier impairment of broiler chickens challenged with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Poul. Sci.* 92, 1764–1773. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03029>.
- Shirley, M.W., 1994. Coccidial parasites from the chicken: discrimination of different populations of *Eimeria tenella* by DNA hybridisation. *Res. Vet. Sci.* 57, 10–14. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(94\)90074-4](https://doi.org/10.1016/0034-5288(94)90074-4).
- Soutter, F., Werling, D., Tomley, F.M., Blake, D.P., 2020. Poultry coccidiosis: design and interpretation of vaccine studies. *Front. Vet. Sci.* 7, 101. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00101>.
- Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M.W., Kubista, M., 2015. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol Detect Quantif.* 11, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.09.001>.

bdq.2015.01.005.

- Tomal, F., Sadrin, G., Gaboriaud, P., Guitton, E., Sedano, L., Lallier, N., Rossignol, C., Larcher, T., Rouille, E., Ledevin, M., Guabiraba, R., Silvestre, A., Lacroix-Lamand'e, S., Schouler, C., Laurent, F., Bussi`ere, F.I., 2023. The caecal microbiota promotes the acute inflammatory response and the loss of the intestinal barrier integrity during severe *Eimeria tenella* infection. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 13, 1250080.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1250080>.
- Tomal, F., Sausset, A., Le Vern, Y., et al., 2023. Microbiota promotes recruitment and pro-inflammatory response of caecal macrophages during *Eimeria tenella* infection. *Gut Pathog.* 15, 65. <https://doi.org/10.1186/s13099-023-00591-8>.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>.
- Vrba, V., Blake, D.P., Poplstein, M., 2010. Quantitative real-time PCR assays for detection and quantification of all seven *Eimeria* species that infect the chicken. *Vet. Parasitol.* 174, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.09.006>.
- Wang, S., Wang, D., Bai, Y., Zheng, G., Han, Y., Wang, L., Hu, J., Zhu, H., Bai, Y., 2024. Expression of Toll-like receptors and host defence peptides in the cecum of chicken challenged with *Eimeria tenella*. *Parasite Immunol.* 46, e13022. <https://doi.org/10.1111/pim.13022>.
- Wattrang, E., Lund'en, A., Ibrahim, O., Dalgaard, T.S., 2023. Phenotypic characterization of *Eimeria tenella*-specific chicken T-cells responding to in vitro parasite antigen re-stimulation. *J. Med. Microbiol.* 72. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001650>.
- Wigley, P., Kaiser, P., 2003. Avian cytokines in health and disease. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 5, 1–14. <https://doi.org/10.1590/s1516-635x2003000100001>.
- Yu, H., Zou, W., Wang, X., Dai, G., Zhang, T., Zhang, G., Xie, K., Wang, J., Shi, H., 2020. Research Note: correlation analysis of interleukin-6, interleukin-8, and C-C motif chemokine ligand 2 gene expression in chicken spleen and cecal tissues after *Eimeria* psj.2019.10.071.

CAPÍTULO II

EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE *Eimeria* SPP. SOBRE A COMPOSIÇÃO E DIVERSIDADE TAXONÔMICA DA MICROBIOTA INTESTINAL DE FRANGOS AO LONGO DO TEMPO PÓS-INFECÇÃO

Resumo

A coccidiose, causada por espécies do gênero *Eimeria*, compromete a integridade intestinal de frangos e pode alterar a composição da microbiota, impactando negativamente a saúde e o desempenho produtivo das aves. Diante disso, o presente estudo avaliou a composição taxonômica e a diversidade da microbiota cecal de frangos submetidos a diferentes cargas parasitárias de *Eimeria* spp. ao longo do tempo pós-infecção. Frangos da linhagem Cobb, com um dia de vida, foram desafiados via oral com a vacina Fortegra em doses correspondentes a 10x e 20x a recomendação do fabricante, enquanto o grupo controle recebeu PBS. O desafio foi padronizado por contagem de oocistos, sendo administrados $8,4 \times 10^6$ e $1,68 \times 10^7$ oocistos para as doses de 10x e 20x, respectivamente. O conteúdo cecal foi coletado aos 7, 14 e 21 dias pós-infecção (dpi). O DNA foi extraído pelo método fenol-clorofórmio, seguido de amplificação da região V3–V4 do gene 16S rRNA e sequenciamento na plataforma Illumina NextSeq 2000. As análises bioinformáticas foram conduzidas na plataforma QIIME 2, com atribuição taxonômica baseada no banco SILVA. A diversidade alfa foi avaliada por múltiplos índices e a diversidade beta por análises de distância e PERMANOVA. O sequenciamento apresentou elevada profundidade e qualidade, com manutenção de aproximadamente 81% das leituras após o processamento. A microbiota cecal foi predominantemente composta pelo filo Firmicutes em todos os grupos, seguido por Bacteroidota, Proteobacteria, Verrucomicrobiota e Actinobacteriota. Firmicutes apresentou maior abundância aos 7 dpi, especialmente no grupo 10x, enquanto Bacteroidota não foi detectado aos 7 dpi nos grupos desafiados, apresentando maior abundância aos 14 dpi, principalmente no grupo 20x. Proteobacteria exibiu maiores proporções aos 7 dpi no grupo 20x a dose, com redução progressiva nos períodos subsequentes. Verrucomicrobiota e Actinobacteriota foram detectados apenas a partir de 14 dpi em ambos os grupos desafiados, em baixas proporções. Em nível de gênero, observou-se predominância de *Ruminococcus*, *Clostridia* e *Lactobacillus*, com variações temporais e entre doses. A análise de diversidade alfa demonstrou aumento progressivo da riqueza e da diversidade filogenética ao longo do tempo em ambos os tratamentos, enquanto diferenças entre doses foram mais

evidentes nos períodos iniciais. A diversidade beta indicou maior modulação da comunidade microbiana no grupo 10x ao longo do tempo, enquanto o grupo 20x apresentou maior estabilidade composicional. De modo geral, os resultados indicam que o tempo pós-infecção exerce influência mais consistente sobre a estrutura e diversidade da microbiota cecal do que a intensidade do desafio por *Eimeria* spp., evidenciando um processo dinâmico de reorganização microbiana ao longo do período avaliado.

Palavra -chave: Microbioma, 16S, NGS, *Eimeria tenella*, *Eimeria maxima*, *Eimeria acervulina*, *Gallus gallus domesticus*.

EFFECT OF DIFFERENT DOSES OF *Eimeria* SPP. ON THE COMPOSITION AND TAXONOMIC DIVERSITY OF THE INTESTINAL MICROBIOTA OF BROILER OVER THE POST-INFECTION PERIOD

Abstract

Coccidiosis, caused by species of the genus *Eimeria*, compromises intestinal integrity in broiler chickens and can alter the composition of the microbiota, negatively affecting bird health and performance. Therefore, the present study evaluated the changes in the taxonomic composition and diversity of the cecal microbiota of broiler chickens subjected to different parasitic loads of *Eimeria* spp. over the post-infection period. One-day-old Cobb broiler chickens were orally challenged with the Fortegra vaccine at doses corresponding to 10x and 20x the manufacturer's recommended dose, whereas the control group received PBS. The challenge was standardized by oocyst counting, with 8.4×10^6 and 1.68×10^7 oocysts administered for 10x and 20x doses, respectively. Cecal contents were collected at 7, 14, and 21 days post infection (dpi). DNA was extracted using the phenol–chloroform method, followed by amplification of the V3–V4 region of the 16S rRNA gene and sequencing on the NextSeq 2000 platform (Illumina, San Diego, CA, USA). Bioinformatic analyses were performed using QIIME 2, with taxonomic assignments based on the SILVA database. Alpha diversity was assessed using multiple indices, and beta diversity was evaluated using distance analyses and PERMANOVA. Sequencing showed high depth and quality, with approximately 81% of the reads retained after processing. The cecal microbiota was predominantly composed of the phylum Firmicutes in all groups, followed by Bacteroidota, Proteobacteria, Verrucomicrobiota, and Actinobacteriota. Firmicutes showed higher abundance at 7 dpi, especially in the 10x group, whereas Bacteroidota was not detected at 7 dpi in the challenged groups and exhibited higher abundance at 14 dpi, particularly in the 20x group. Proteobacteria displayed higher proportions at 7 dpi in the group with 20 times the dose, with a progressive reduction at subsequent time points. Verrucomicrobiota and Actinobacteriota were detected only from 14 dpi in both challenged groups, at low proportions. At the genus level, *Ruminococcus*, *Clostridia*, and *Lactobacillus* predominated, with temporal and dose-related variations observed. Alpha diversity analysis demonstrated a progressive increase in richness and phylogenetic diversity over time in both treatments, whereas differences between doses were more evident at earlier points. Beta diversity indicated greater modulation of the microbial community over time in the 10x group, whereas the 20x group showed greater compositional stability. Overall, the results indicate that post-infection time exerts a more

consistent influence on the structure and diversity of the cecal microbiota than the intensity of the *Eimeria* spp. challenge, highlighting the dynamic process of microbial reorganization throughout the evaluation period.

Key-word: Microbiome, 16S, NGS, *Eimeria tenella*, *Eimeria maxima*, *Eimeria acervulina*, *Gallus gallus domesticus*.

1. INTRODUÇÃO

A coccidiose é uma enfermidade parasitária que acomete o trato gastrointestinal de aves domésticas, sendo responsável por relevantes perdas econômicas na indústria avícola em nível mundial. Essa doença é causada por protozoários do gênero *Eimeria*, cujas espécies apresentam tropismo específico por diferentes segmentos do intestino. Dentre elas, destacam-se *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* e *Eimeria tenella*, sendo esta última de maior relevância devido ao seu elevado grau de patogenicidade (MACDONALD et al., 2017; BLAKE 2020; LÓPEZ-OSORIO et al., 2020; EL-SHALL et al., 2022).

As infecções por *Eimeria* spp. podem causar lesões no epitélio da mucosa intestinal, resultando em atrofia das vilosidades e redução da população de células epiteliais funcionais. Essas alterações afetam diretamente a morfologia intestinal, alterando parâmetros como altura e largura das vilosidades e profundidade das criptas, que são importantes indicadores de saúde intestinal. Como consequência das lesões, ocorre aumento da permeabilidade da barreira intestinal (SONG et al., 2013; ZHOU et al., 2023; CHEN et al., 2025). O comprometimento da integridade e da funcionalidade da barreira intestinal interfere nos processos digestivos e na absorção de nutrientes, levando ao desequilíbrio da homeostase intestinal, redução da conversão alimentar, menor ganho de peso e queda na produtividade dos lotes, com prejuízos à produção avícola (MADLALA et al., 2021).

O intestino dos frangos é composta por uma microbiota altamente diversa, organizada em um sistema dinâmico e estável, desempenhando um papel fundamental na manutenção da saúde intestinal do hospedeiro (ZHOU et al., 2020). Adicionalmente, a microbiota intestinal contribui para a nutrição do hospedeiro, por meio da produção de energia e nutrientes, como vitaminas, aminoácidos e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Além disso, exerce papel importante na modulação da resposta imunológica, incluindo a estimulação da produção de muco protetor no intestino (SHANG et al., 2018; MAHMOOD; GUO, 2020).

A composição da microbiota intestinal pode variar em função de diversos fatores, como dieta, genética, idade e processos infecciosos, incluindo a coccidiose (POWER et al., 2014; DUCATELLE et al., 2015). Nesse contexto, as lesões intestinais induzidas por *Eimeria* spp. promovem alterações significativas no ambiente intestinal (MADLALA et al., 2021). Como consequência da modificação da microbiota, ocorre alteração no metabolismo dos AGCC, fundamentais para a manutenção da homeostase intestinal, pois contribuem para a redução do pH luminal limitam a proliferação de bactérias oportunistas (CHEN et al., 2025).

As modificações na microbiota intestinal associadas à infecção por *Eimeria* spp. podem ser avaliadas por meio de análises de diversidade alfa, que refletem a riqueza e a uniformidade

microbiana dentro de um mesmo grupo experimental, e de diversidade beta, que permitem identificar diferenças na composição microbiana entre diferentes condições experimentais (MACDONALD et al., 2017; HAMILTON et al., 2020; ZHOU et al., 2020; CAMPOS et al., 2024; DU et al., 2024). Essas abordagens são fundamentais para compreender como a infecção influencia na estabilidade da homeostase da microbiota intestinal.

Diferentes regiões do intestino apresentam composições microbianas distintas. Entre elas, o ceco se destaca por apresentar maior diversidade e abundância, devido à retenção prolongada do conteúdo digestivo e à intensa atividade fermentativa (GONG et al., 2002; OAKLEY et al., 2014). Dessa forma, a análise do conteúdo cecal constitui uma estratégia adequada para avaliar alterações do microbioma em resposta à infecção por *Eimeria* spp.

Diante disso, embora existam estudos que descrevem o impacto de espécies de *Eimeria* sobre a microbiota intestinal de aves de produção, ainda são necessárias mais informações sobre as alterações microbianas ao longo de diferentes dias pós-infecção e sob diferentes doses do patógeno. Assim, o presente estudo avaliou as modificações na composição taxonômica e na diversidade da microbiota cecal de frangos submetidos a diferentes doses de oocistos vacinais de *Eimeria* spp. ao longo do tempo pós infecção.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Desafio vacinal e condições experimentais

Frangos da linhagem Cobb, com 1 dia de vida, foram desafiados oralmente com a vacina Fortegra® (MSD Saúde Animal), que contém oocistos atenuados de *Eimeria tenella*, *E. acervulina* e *E. maxima*, no momento da chegada ao local do experimento. As aves receberam doses equivalentes a 10 e 20 vezes a recomendada pelo fabricante. Para padronizar a dose infectante, realizou-se a contagem de oocistos em câmara de *Neubauer* para estabelecer o número de oocistos/dose vacinal. Foram inoculados nas aves $8,4 \times 10^6$ oocistos para o grupo 10x, e, $1,6 \times 10^7$ oocistos para o grupo 20x.

As aves de 1 dia de idade, foram mantidas em gaiolas metálicas (90 x 45 x 40 cm), dispostas em baterias de três andares, com densidade aproximada de quatro aves por metro quadrado. As gaiolas foram instaladas em um galpão telado, com ambiente climatizado, equipado com lâmpadas de aquecimento e ventiladores, usados conforme a idade das aves e as condições climáticas. Durante todo o período experimental, as aves tiveram acesso *ad libitum* à água e ao alimento. Todas animais receberam o mesmo tipo de ração de acordo com sua fase

de crescimento, pré inicial, de 1 a 7 dia de idade (Tabela 1), e inicial, de 8 a 21 dia de idade (Tabela 2), formulada de acordo com as recomendações de Rostagno et al. (2017).

Tabela 1. Composição e valores nutricionais calculados das dietas experimentais fornecidas a frangos de corte de 1 a 7 de idade, e 8 a 21 dia de idade.

Composição Alimentar		
Ingredientes	Pré- Inicial	Inicial
Milho (Kg)	54,63	58,63
Farelo de soja (Kg)	38,91	35,02
Óleo de soja (Kg)	1,94	2,4
Fosfato bicálcico (Kg)	1,90	1,55
Calcário (Kg)	1,00	0,84
Sal Comun (Kg)	0,44	0,42
DL-Metionina (Kg)	0,35	0,30
L-Lisina (Kg)	0,30	0,28
L-Treonina (Kg)	0,12	0,09
Cloreto de Colina (60%) (Kg)	0,06	0,12
Min-Aves (Kg)	0,12	0,12
VITINI-AVE (Kg)	0,12	0,12
Atendimento das Exigências Nutricionais		
Ingredientes	Pré- Inicial	Inicial
Ácido linoleico (%)	2,37	2,70
Arginina dig.aves (%)	1,42	1,31
Arginina total (%)	1,51	1,40
Calcio (%)	1,00	0,84
Cloro (%)	0,29	0,28
Energ. Met.aves (Mcal/Kg)	2,96	3,05
Fibra bruta (%)	3,36	-
Fosforo disponível (%)	0,47	0,40
Fosforo total (%)	0,71	2,00
Gordura (%)	4,35	4,96
Lisina dig.aves (%)	1,33	1,22
Lisina total (%)	1,46	1,34

Met.+cist.dig.aves (%)	0,96	0,88
Met.+cistina total (%)	1,05	0,96
Metionina dig.aves (%)	0,66	0,60
Metionina total (%)	0,70	0,63
Potássio (%)	0,88	0,82
Proteína bruta (%)	23,00	21,49
Sódio (%)	0,22	0,21
Treonina dig.aves (%)	0,87	0,79
Treonina total (%)	0,99	0,91
Triptofano dig.aves	0,25	0,23
Triptofano total (%)	0,28	0,26
Valina dig.aves (%)	0,92	0,86
Valina total (%)	1,04	0,98

Após o desafio, os animais foram distribuídos em três grupos experimentais: GC (grupo controle - aves desafiadas com PBS; G1 (aves desafiadas com *Eimeria* spp em dose correspondente a 10x a recomendação basal); G2 (aves desafiadas com *Eimeria* spp em dose correspondente a 20x a recomendação basal) . Cada grupo foi composto por 24 aves. Nos dias 7, 14 e 21 após a vacinação, oito aves de cada grupo foram eutanasiadas por deslocamento cervical de acordo com as normas do CONCEA e as recomendações da Resolução Normativa 37/2018. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA nº 1852071223).

2.2. Coleta das amostras e extração de DNA

Após a eutanásia, oito aves de cada grupo foram necropsiadas e os cecos foram coletados. O conteúdo cecal foi retirado, acondicionado em tubos estéreis e armazenado a -80 °C até a extração do material genético.

Foram pesados 50 mg do conteúdo cecal, a partir dos quais o DNA foi posteriormente extraído. A extração do DNA do conteúdo cecal foi realizada pelo método fenol-clorofórmio, conforme descrito por Sambrook et al. (1989). As amostras foram diluídas e padronizadas em 5ng de DNA por µL. A pureza e as concentrações de DNA e RNA das amostras foram determinadas em espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.).

2.3. Construção da Biblioteca

Para a construção da biblioteca foram utilizados *primers* que amplificam a região V3 e V4 do gene 16S (KLINDWORTH et al., 2013). Foram utilizados 0,15 μ M de cada *primer*, 1X de SuperFi II (ThermoFisher Scientific) e 5ng de DNA de cada amostra. As condições de termociclagem foram: 98 °C por 30 s, seguidas de 25 ciclos de 98 °C por 10 s, 60 °C por 20 s e 72 °C por 30 s, com extensão final a 72 °C por 5 min. Os *amplicons* obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose à 2%. Em seguida, as amostras foram purificadas com o método de *beads* magnéticas (ThermoFisher Scientific). Após purificação, realizou-se a reação de indexação, com 10 μ L de *index*, 25 μ L de SuperFi II (ThermoFisher Scientific) e 5 μ L de amostra. Sob as condições: 98°C 3 min, seguidas de 8 ciclos de 98 °C por 10 s, 60 °C por 20 s, 72 °C por 30 s, com extensão final a 72 °C por 5min. As amostras foram novamente purificadas e submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% para verificar a presença de dímeros de *index*. Após a construção e purificação da biblioteca, as concentrações foram novamente determinadas em espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.) e as amostras diluídas e padronizadas em 2 nM. Posteriormente, 4 μ L de cada amostra foram reunidos em um único microtubo de 2 mL, formando a biblioteca final de 2nM, que foi sequenciada com 40% de phiX em modo *paired-end* (2 x 300pb) em uma *flowcell* P1 (100 milhões de *reads*). O sequenciamento foi realizado no equipamento NextSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA, USA).

2.4. Bioinformática

As análises de bioinformática foram conduzidas utilizando a plataforma QIIME 2 (CAPORASO et al., 2010). As amostras foram submetidas ao processo de *denoising* utilizando a metodologia DADA2 (CALLAHAN et al., 2016), aplicando corte de 17 pb na ponta 5' e 21 pb na extremidade 3', resultando em leituras de 260 pb. Durante esse processo, sequências quiméricas foram identificadas e removidas, sendo mantida, em média, 81,3 % das leituras iniciais como de alta qualidade e não quiméricas para as análises subsequentes. A atribuição taxonômica foi realizada utilizando o banco de dados SILVA (QUAST et al., 2012). Em seguida, foi realizada a análise de alpha rarefação para padronizar a profundidade (número de *reads*) entre as amostras, requisito necessário para as análises de diversidade, sendo utilizada uma profundidade de 30.000 *reads*. A composição microbiana foi avaliada por meio do Diagrama de Venn, gerado pela ferramenta online *Interactive Venn* (<https://www.interactivenn.net/>), e por mapas de calor construídos a partir dos dados de abundância relativa das amostras, após transformação pelo método CLR (*centered log-ratio*).

A diversidade alfa foi estimada pelos índices de Evenness, Faith PD (FAITH, 1992), *Observed* e Shannon. Para a análise de diversidade beta, a matriz de dissimilaridade entre amostras foi calculada pelo método de Bray–Curtis, utilizando o pacote “Vegan” do R (DIXON, 2003). Adicionalmente, foi realizada a matriz de distância da diversidade entre amostras, com base na análise permutacional multivariada de variância (PERMANOVA). A visualização gráfica da dispersão dos dados da diversidade beta foi obtida por meio da análise de coordenadas principais (PCoA).

2.5. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no Prisma, para Alfa-diversidade, e *software* R, interface RStudio para Beta-diversidade. Para a análise dos índices ecológicos da alfa diversidade, foi aplicado o teste de normalidade Shapiro-Wilk. As amostras com distribuição normal foram submetidas à ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey ($p < 0,05$), enquanto amostras com distribuição não paramétrica foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). Para a análise de diversidade beta, foi utilizada PERMANOVA com 999 permutações, a fim de avaliar se a composição microbiana diferia significativamente entre os grupos, considerando significância estatística para $p < 0,05$.

3. RESULTADO

3.1 Análise dos dados brutos das sequências 16S

A demultiplexagem das sequências permitiu a separação dos *reads* por amostra com base nos índices de cada biblioteca. A mediana do número de *reads* por amostra foi de 217.849 tanto para as leituras *forward* quanto para as *reverse*. O número máximo de *reads* por amostra foi de 583.480, totalizando 15.031.209 *reads* em cada direção. Esses resultados indicam que a demultiplexagem foi eficiente e que todas as amostras apresentaram profundidade de sequenciamento adequada para as análises subsequentes.

Após o processamento *denoising*, que inclui correção de erros de sequenciamento e remoção de quimeras, foram obtidas 12.242.548 observações totais, com aproximadamente 81% das leituras mantidas, o que indica a maior parte das sequências era de boa qualidade para as análises subsequentes.

3.2. Composição taxonômica

Aos 7 dpi, a interseção entre os três grupos analisados incluiu 57 táxons (Figura 1A).

O grupo 10x apresentou 9 táxons exclusivos, o controle 13 táxons exclusivos, e o grupo 20x 6 táxons exclusivos.

Em 14 dpi (Figura 1B), a interseção entre os três grupos analisados foi de 82 táxons. O número de táxons exclusivos diminuiu nos grupos tratados e aumentou em 4 táxons no grupo controle. Já em 21 dpi (Figura 1C), a interseção de táxons entre os três grupos aumentou para 97 táxons, enquanto o número de táxons exclusivos em cada grupo diminuiu.

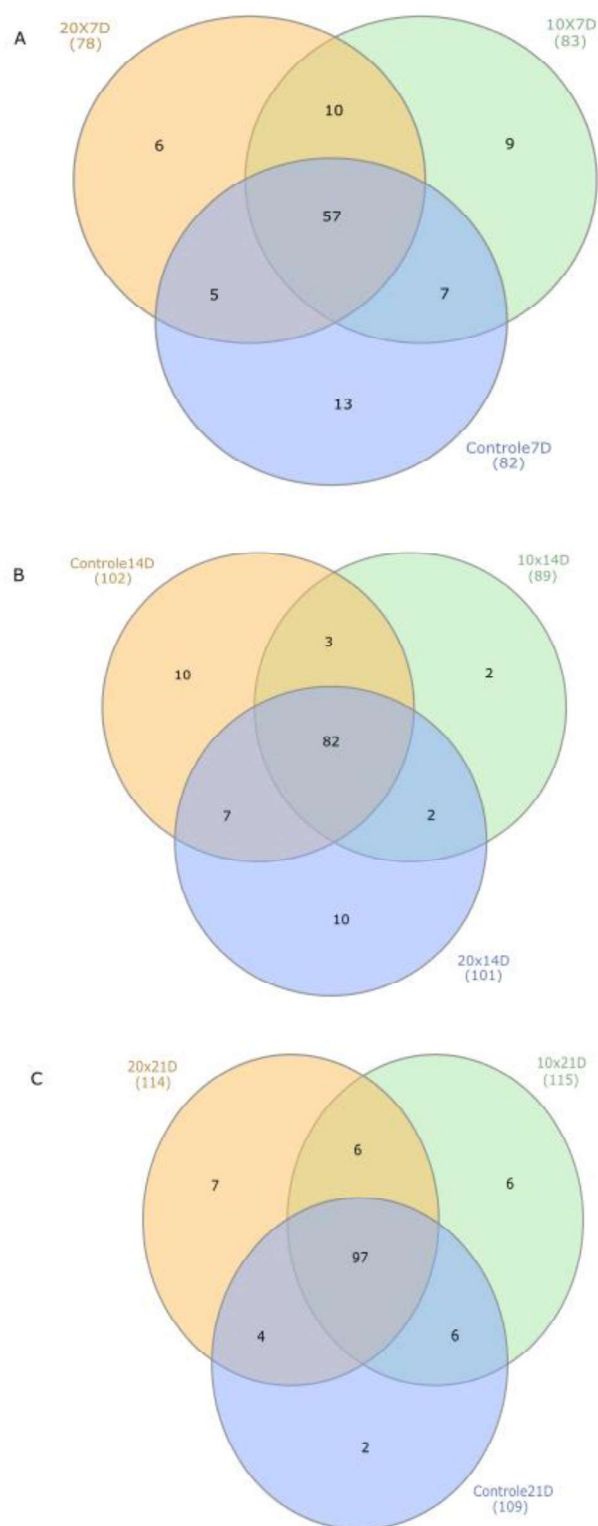


Figura 1: Diagrama de Venn mostrando os táxons exclusivos e compartilhados entre os grupos controle e os tratamentos 10 e 20x a dose vacinal, nos diferentes tempos de análise 7 dpi (A), 14 dpi (B), e 21 dpi (C). Os números dentro dos círculos correspondem ao número de Variante de Sequência de Amplicon (ASVs) observados em cada grupo, enquanto os números nas

interseções indicam os ASVs compartilhados entre os grupos.

Para a análise da composição taxonômica dentro de cada dose ao longo dos dias, na dose 10x (Figura 2A), os três dias de análise apresentaram uma interseção de 69 táxons, valor semelhante ao observado na dose 20x (Figura 2B), que apresentou 67 táxons comuns entre os três dias avaliados. Na dose 10x, aos 7 dpi, foram observados sete táxons exclusivos desse grupo, além de um táxon em interseção com 14 dpi e seis táxons em interseção com 21 dpi. Na dose 20x, aos 7 dpi, foram identificados nove táxons exclusivos do grupo, quatro táxons em interseção com 14 dpi e cinco táxons em interseção com 21 dpi.

Em ambos as doses, aos 14 dpi, foram observados apenas três táxons exclusivos de cada grupo. A interseção entre 14 dpi e 21 dpi apresentou 16 táxons na dose 10x e 26 táxons na dose 20x. Aos 21 dpi, foram observados 24 táxons exclusivos na dose 10x e 18 táxons na dose 20x.

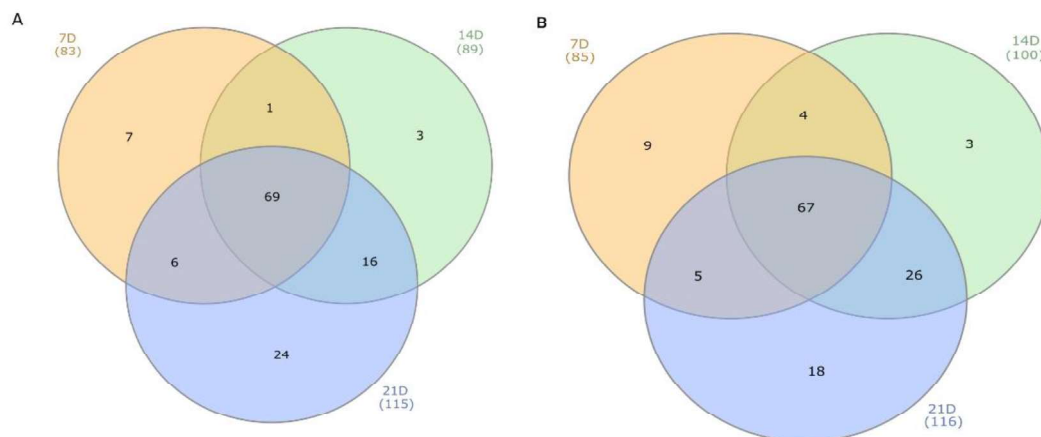


Figura 2: Diagrama de Venn mostrando os táxons exclusivos e compartilhados entre os grupos 7, 14, 21 dpi dentro de 10 x a dose (A) e 20x a dose (B). Os números dentro dos círculos representam o número de Variante de Sequência de Amplicon (ASVs) observados em cada grupo, enquanto os números nas interseções indicam os ASVs compartilhados entre os grupos.

Ao nível de filo (Figura 3), o mais abundante foi Firmicutes, seguido por Bacteroidota, Proteobacteria, Verrucomicrobiota, Actinobacteriota. O filo Firmicutes foi presente em todas em todos os grupos analisados, isto é, controle, 10x e 20x a dose. Exceto no grupo 14 dpi 20x

a dose (65,78%), todos os outros grupos tiveram porcentagem de Firmicute em torno de 80%, sendo o grupo 7 dpi 10x a dose, o qual apresentou maior porcentagem de abundância com 90,45%.

O segundo filo mais abundante, Bacterioidota, não foi detectado nos grupos 7dpi 10x a dose e 20x a dose, e no grupo controle apresentou 2,08%. No tratamento 10x a dose, o grupo 14dpi apresentou 16,08% enquanto em 21dpi a abundância foi de 14,68%. Já no tratamento 20x a dose, foram observados 28,46% em 14 dpi e 10,94% em 21 dpi. No grupo controle, as porcentagens observadas foram 10,3% em 14 dpi e 8,39% em 21dpi.

Considerando o filo Proteobacteria, as maiores porcentagens de abundância são referentes a 7 dpi. Nesse período de análise, o grupo controle apresentou 8,91%, o grupo 10x a dose 9,13% e o grupo 20x a dose 20,73%. Em 14dpi, a abundância foi de 0,34% no grupo controle, e 0,51% em 10x a dose e 4,64% 20x a dose. Para 21 dpi, os valores observados foram 0,15% no controle, 0,3% em 10x a dose e 2,38% em 20x a dose.

Quanto ao filo Verrucomicrobiota, não foi observada sua presença em nenhuma das análises realizadas em 7 dpi. Para 14 dpi, o controle apresentou 0,29%, enquanto os grupos 10x e 20x a dose apresentaram 2,83% e 4,71%, respectivamente. Em 21 dpi, a abundância foi de 2,05% para o controle, 4,93% e 1,51% para 10 e 20x a dose, respectivamente.

De forma semelhante ao observado para Verrucomicrobiota, o filo Actinobacteriota não foi detectado em nenhum dos grupos em 7 dpi. Nos demais grupos de tempos e dose a porcentagem de abundância do filo foi inferior à 1%.

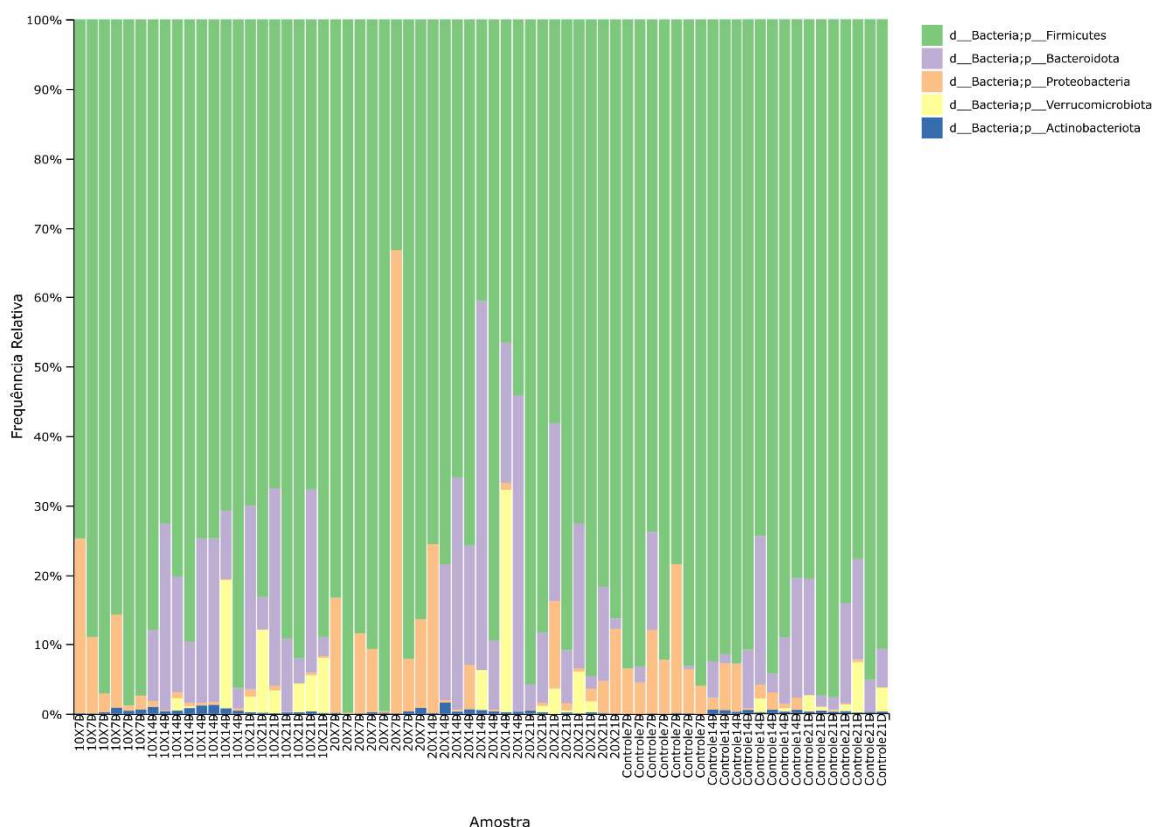


Figura 3: Perfil taxonômico das amostras analisadas.

As amostras analisadas no mapa de calor, chegaram ao nível de família e gênero. Aos 7 dpi (Figura 4), apresentaram domínio de taxons como Lachnospiraceae, Ruminococcus, *Escherichia_Shigella*, *Lactobacilluse* com baixa quantidade de *Alistirpes*, *Bacterioides*, *Bacillus*, *Parabacterioides*, *Gordonibacter*, *Eubacterium nodatum*.

Em 14 dpi (Figura 5), apresentou abundância relativa dos táxons com predominância de *Clostridia*, Lachnospiraceae, *Ruminococcus*, *Alistipes*, Ruminococcaceae, *Lactobacillus*, Incerteae e *Subdoligranulum*. E os táxons com baixa abundância relativa, pode-se encontrar Enterobacteriaceae, *Oscillospira*, *Stenothophomonas*, *Bacterioides*.

Aos 21 dpi (Figura 6), a composição taxonômica apresentou predominância relativa Lachnospiraceae, *Rominococcus*, *Clostridia*, *Erysipelatoclostridium*, *Lactobacillus* e com menor abundância relativa, Sphiingomonadaceae, *Enhydrobacter*, *Rhodospirillales* e *Bacterioides*.

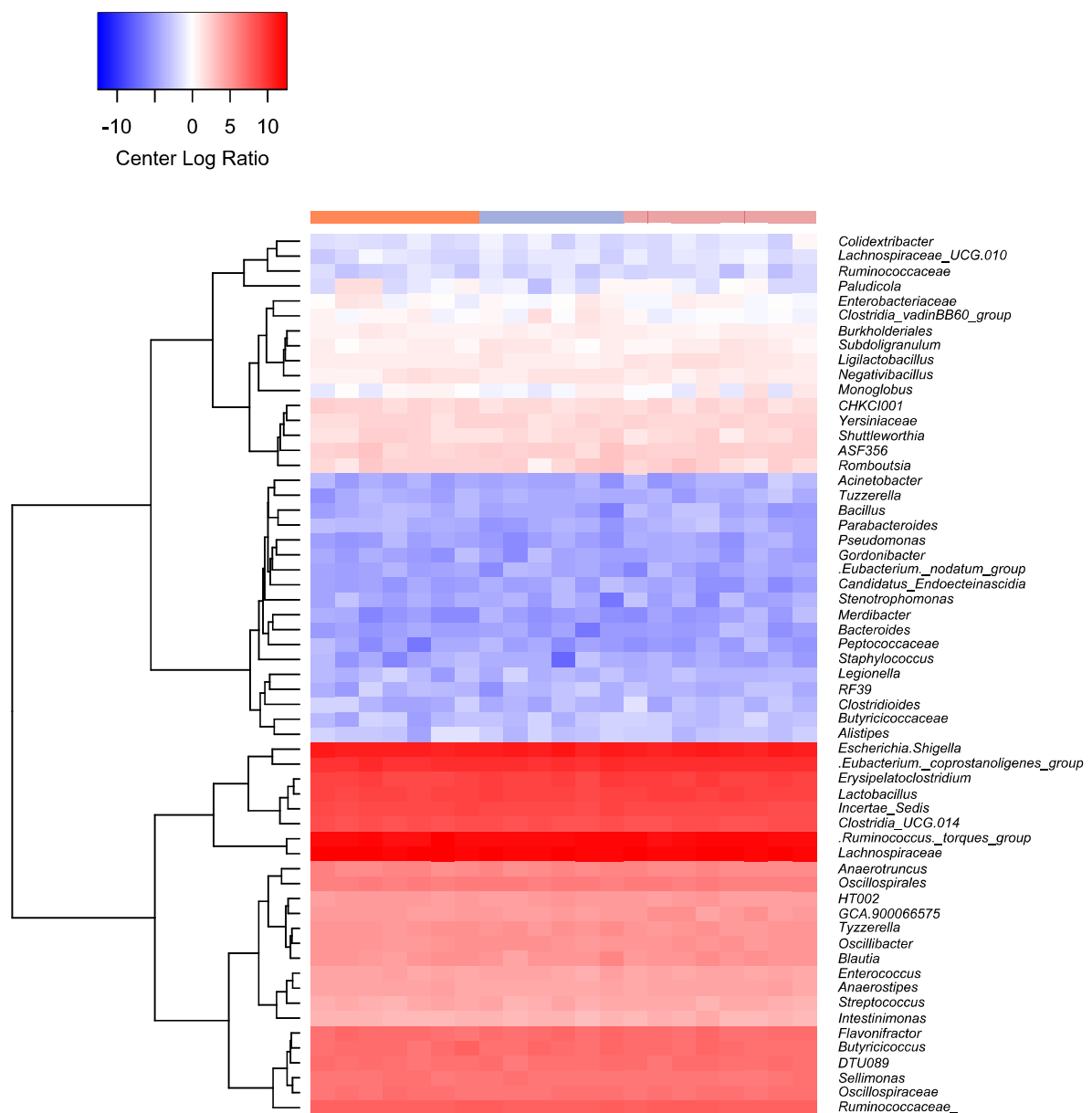


Figura 4: Mapa de calor exibindo a abundância relativa média da microbiota do ceco, em 7 dpi, comparando controle, 10x e 20x dose. O mapa de calor representa a o valor dos dados transformados de abundância relativa dos táxons microbianos cada amostra. Os valores relativos das bactérias são indicados pela intensidade da cor, quanto maior a tonalidade em vermelho, maior o valor representado da abundância, quanto mais azul menor abundância.

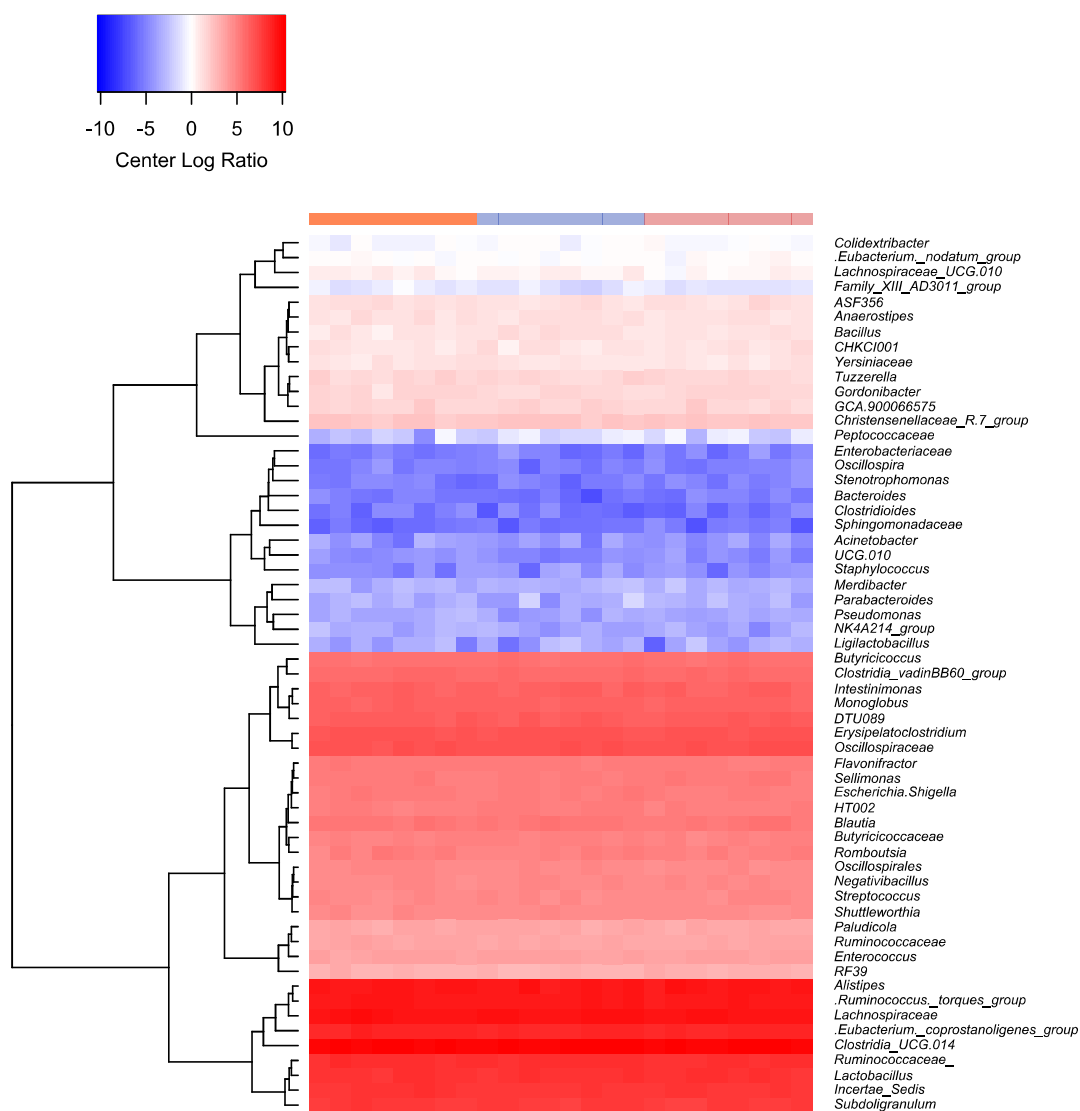


Figura 5: Mapa de calor exibindo a abundância relativa média da microbiota do ceco, em 14 dpi, comparando controle, 10x e 20x dose. O mapa de calor representa a o valor dos dados transformados de abundância relativa dos táxons microbianos cada amostra. Os valores relativos das bactérias são indicados pela intensidade da cor, quanto maior a tonalidade em vermelho, maior o valor representado da abundância, quanto mais azul menor abundância.

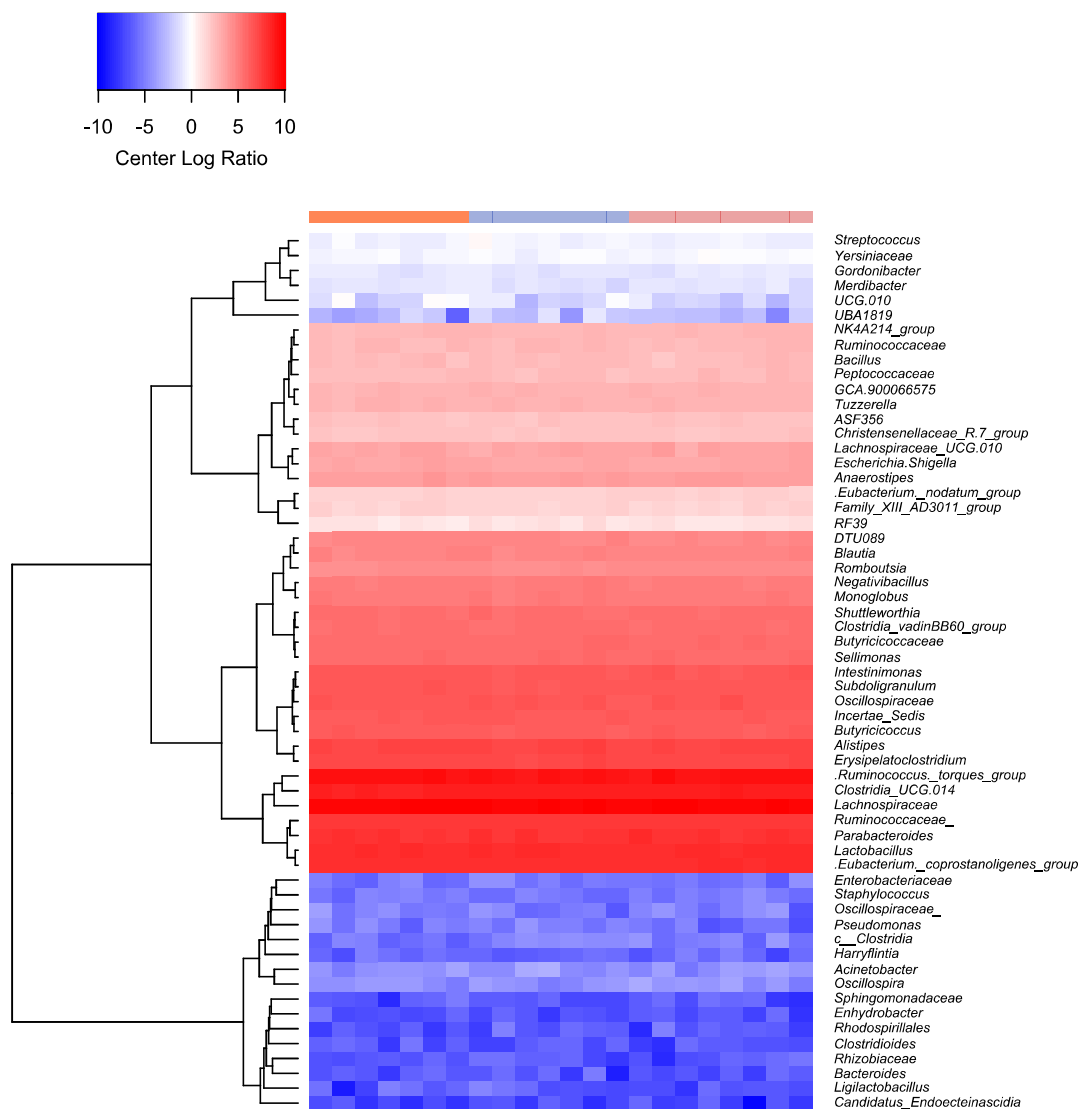


Figura 6: Mapa de calor exibindo a abundância relativa média da microbiota do ceco, em 21 dpi, comparando controle, 10x e 20x dose. O mapa de calor representa a o valor dos dados transformados de abundância relativa dos táxons microbianos cada amostra. Os valores relativos das bactérias são indicados pela intensidade da cor, quanto maior a tonalidade em vermelho, maior o valor representado da abundância, quanto mais azul menor abundância.

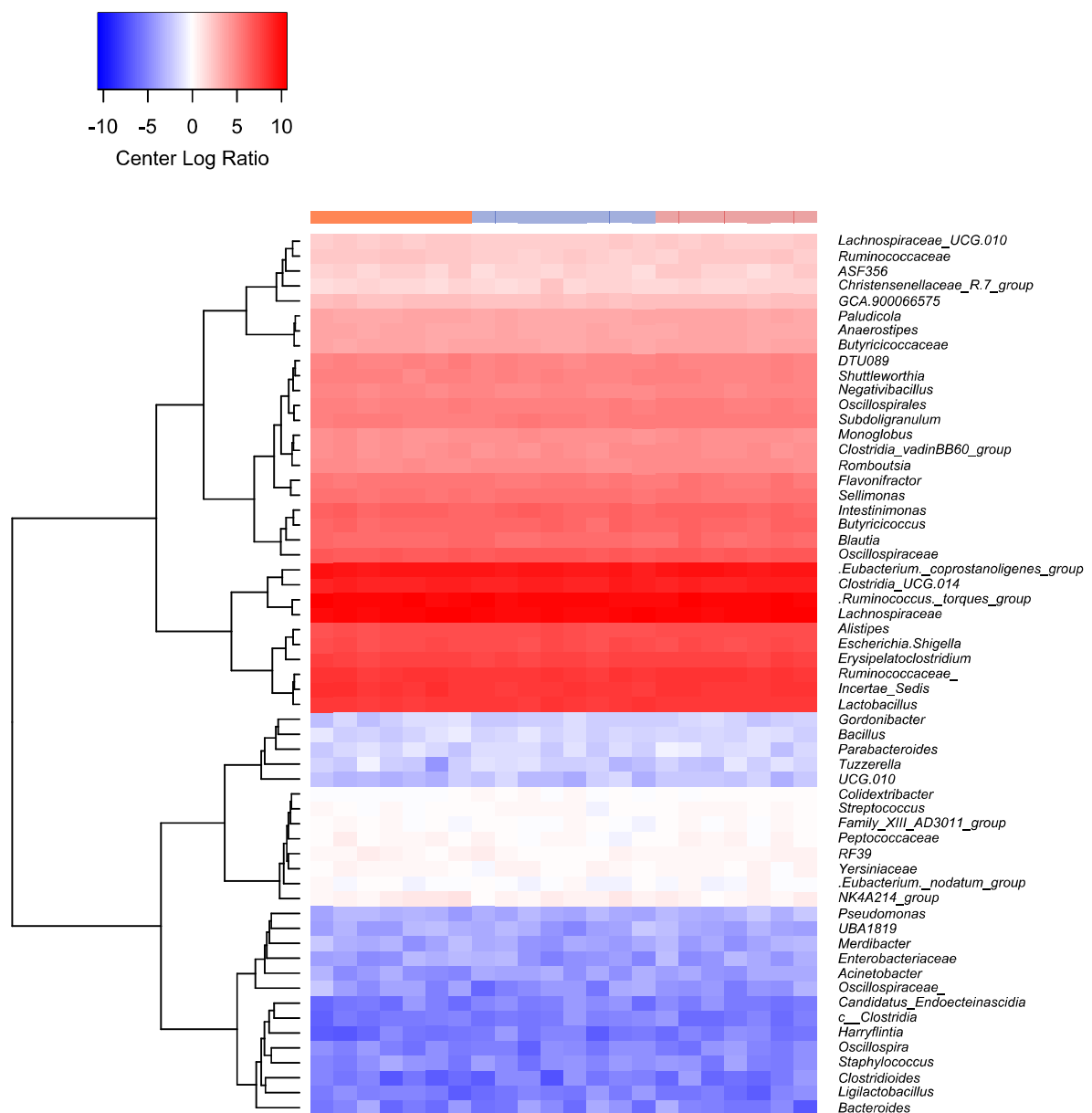


Figura 7: Mapa de calor exibindo a abundância relativa média da microbiota do ceco, nos animais controle, comparando 7dpi, 14 dpi e 21 dpi. O mapa de calor representa a o valor dos dados transformados de abundância relativa dos táxons microbianos cada amostra. Os valores relativos das bactérias são indicados pela intensidade da cor, quanto maior a tonalidade em vermelho, maior o valor representado da abundância, quanto mais azul menor abundância.

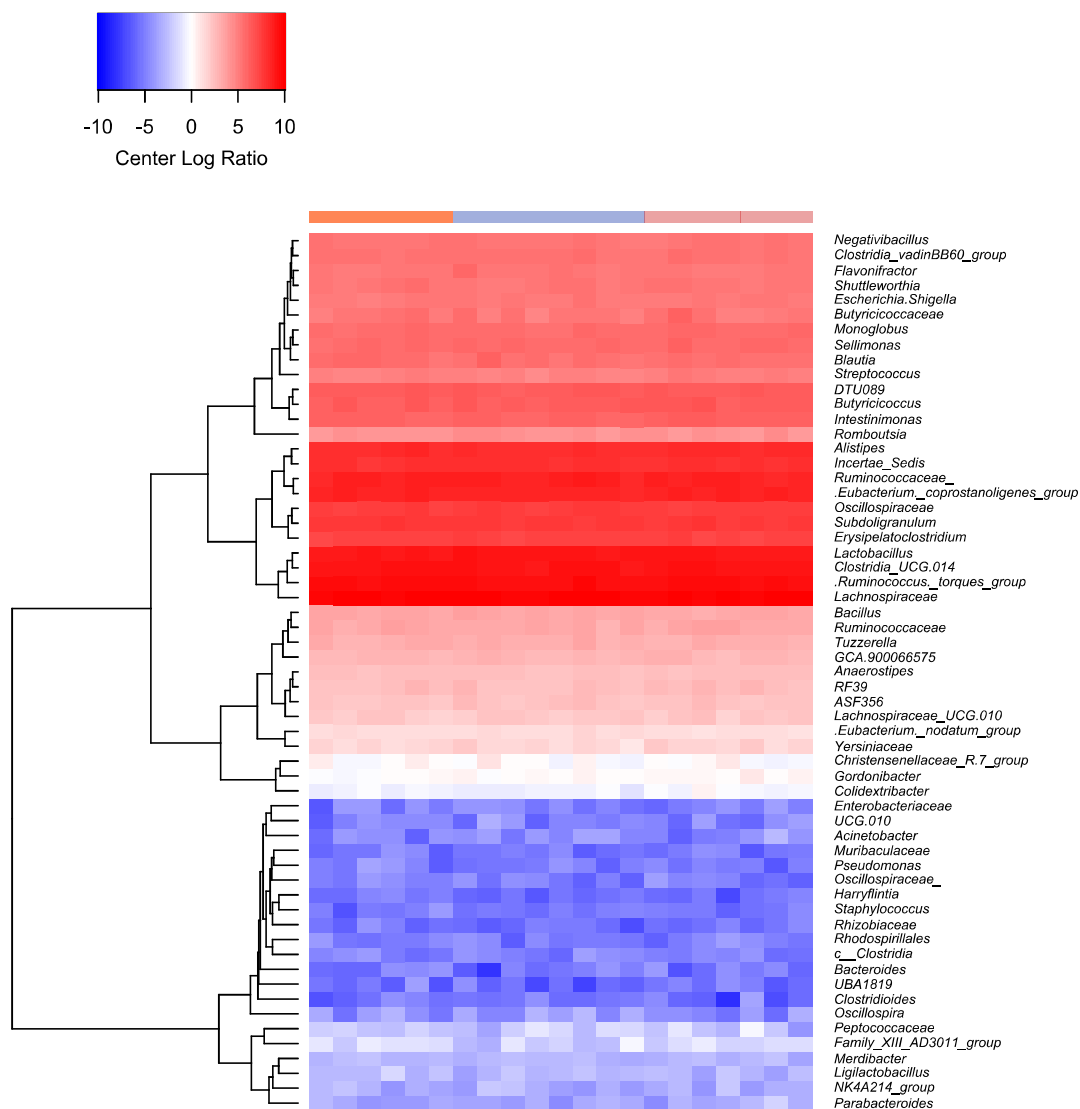


Figura 8: Mapa de calor exibindo a abundância relativa média da microbiota do ceco, em 10x dose ao longo do tempo, comparando 7, 14 e 21 dpi. O mapa de calor representa a o valor dos dados transformados de abundância relativa dos táxons microbianos cada amostra. Os valores relativos das bactérias são indicados pela intensidade da cor, quanto maior a tonalidade em vermelho, maior o valor representado da abundância, quanto mais azul menor abundância.

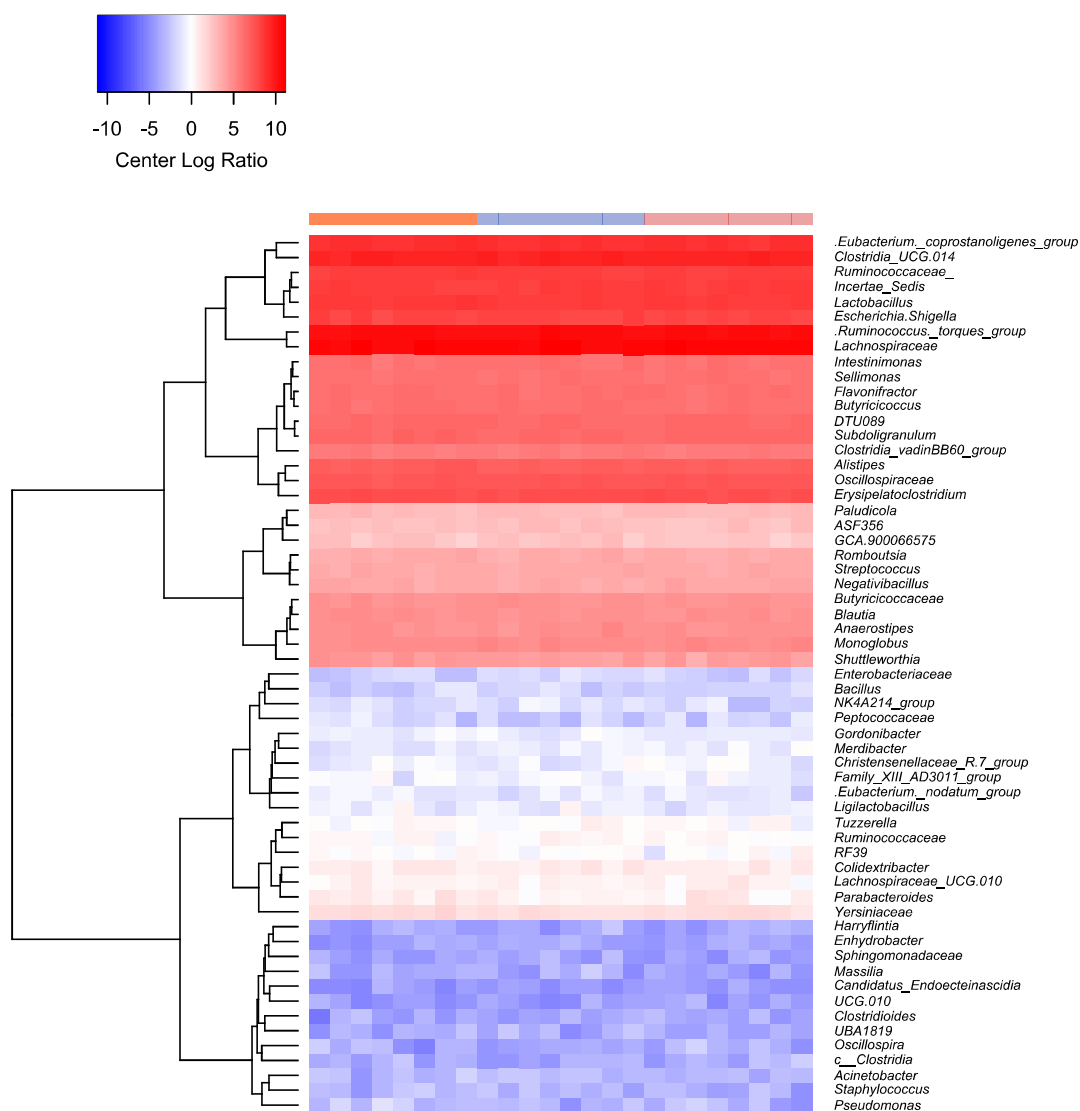


Figura 9: Mapa de calor exibindo a abundância relativa média da microbiota do ceco, em 20x dose ao longo do tempo, comparando 7, 14 e 21 dpi. O mapa de calor representa a o valor dos dados transformados de abundância relativa dos táxons microbianos cada amostra. Os valores relativos das bactérias são indicados pela intensidade da cor, quanto maior a tonalidade em vermelho, maior o valor representado da abundância, quanto mais azul menor abundância.

Os taxóns *Eubacterium coprostanoligenes*, *Clostridia*, *Ruminococcus_torques* e membros da família Lachnospiraceae, foram os mais abundantes no grupo controle. Tendo como menor abundancia gêneros como *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Bacterioides*.

O padrão taxonômico (Figura 8) das amostras tratadas com 10x a dose apresentou predomínio de táxons como *Lactobacillus*, *Clostridia*, *Ruminococcus*, *Lachnospiraceae*, *Alistipes*, *Incetae*, *Eubacterium*, além de menor abundância relativa de táxons como Enterobacteriaceae, *Acinetobacter*, Muribaculaceae e *Pseudomonas*.

As amostras tratadas com 20x a dose (Figura 9) apresentaram predominância de *Ruminococcus*, *Lachnospiraceae*, *Eubacterium* e *Clostridia*, evidenciada pela maior intensidade das cores. Também foram observados táxons predominantes em outros grupos, como *Alistipes* e *Lactobacillus*, porém com menor grau de abundância relativa. Em menor abundância, nessas amostras, encontram-se táxons como *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, de forma semelhante ao grupo 10x. Além disso, o táxon *Enterobacteriaceae* também está presente em baixa quantidade, porém em maior proporção quando comparado ao grupo 10x.

3.3.Diversidade microbiana

3.3.1 Alfa-diversidade

A análise de alpha-rarefação foi realizada com um corte de 30.000 reads, utilizando as métricas Faith, Shannon e *Observed Features*. Em seguida, foi avaliada a diversidade alfa das amostras com base nos índices Evenness, Faith, *Observed Features* e Shannon.

Ao longo do tempo, para o tratamento com 10x a dose vacinal (Figura 10A), a equitabilidade microbiana, avaliada pelo índice de Pielou, apresentou diferença significativa entre 7 e 14 dpi ($p\text{-valor} = 0,04$), sendo 14 dias. A diversidade filogenética, avaliada pelo índice de Faith, diferiu significativamente entre todos os tempos analisados, com diferenças observadas entre 7 e 14 dpi, 7 e 21 dpi e 14 e 21 dpi (para todas as comparações, $p\text{-valor} < 0,0001$), tendo a diversidade filogenética crescente ao longo do tempo. A riqueza microbiana, avaliada pelo índice *Observed*, foi mais alta em 14 dpi, e 7 dpi o valor mais baixo. Adicionalmente, o índice *Observed* apresentou diferenças significativas entre todos os tempos, sendo observadas diferenças entre 7 e 14 dpi ($p\text{-valor} = 0,002$), 7 e 21 dpi ($p\text{-valor} < 0,0001$) e 14 e 21 dpi ($p\text{-valor} < 0,0001$). A diversidade, avaliada pelo índice de Shannon, apresentou diferença significativa apenas entre 7 e 14 dpi ($p\text{-valor} = 0,001$), tendo o valor de diversidade crescente ao longo do tempo.

Para o tratamento com 20x a dose vacinal (Figura 10B), em todos os índices analisados nessa dose, houve aumento progressivo ao longo do tempo. A equitabilidade microbiana, avaliada pelo índice de Evenness, apresentou diferença significativa apenas entre 7 e 21 dpi ($p\text{-valor} = 0,02$), não havendo diferenças entre os demais tempos analisados. A diversidade filogenética, avaliada pelo índice de Faith, aumentou ao longo do tempo, e diferiu significativamente entre todos os tempos, com diferenças observadas entre 7 e 14 dpi ($p\text{-valor} < 0,0001$), 7 e 21 dpi ($p\text{-valor} < 0,0001$) e 14 e 21 dpi ($p\text{-valor} = 0,007$). A riqueza microbiana, avaliada pelo índice *Observed*, assim como índice Faith, apresentou aumento seu valor ao longo

do tempo. Além disso, também apresentou diferenças significativas entre todos os tempos, com diferenças entre 7 e 14 dpi ($p\text{-valor} = 0,009$), 7 e 21 dpi ($p\text{-valor} < 0,0001$) e 14 e 21 dpi ($p\text{-valor} = 0,001$). A diversidade, avaliada pelo índice de Shannon, apresentou diferença significativa apenas entre 7 e 21 dpi ($p\text{-valor} = 0,0004$).

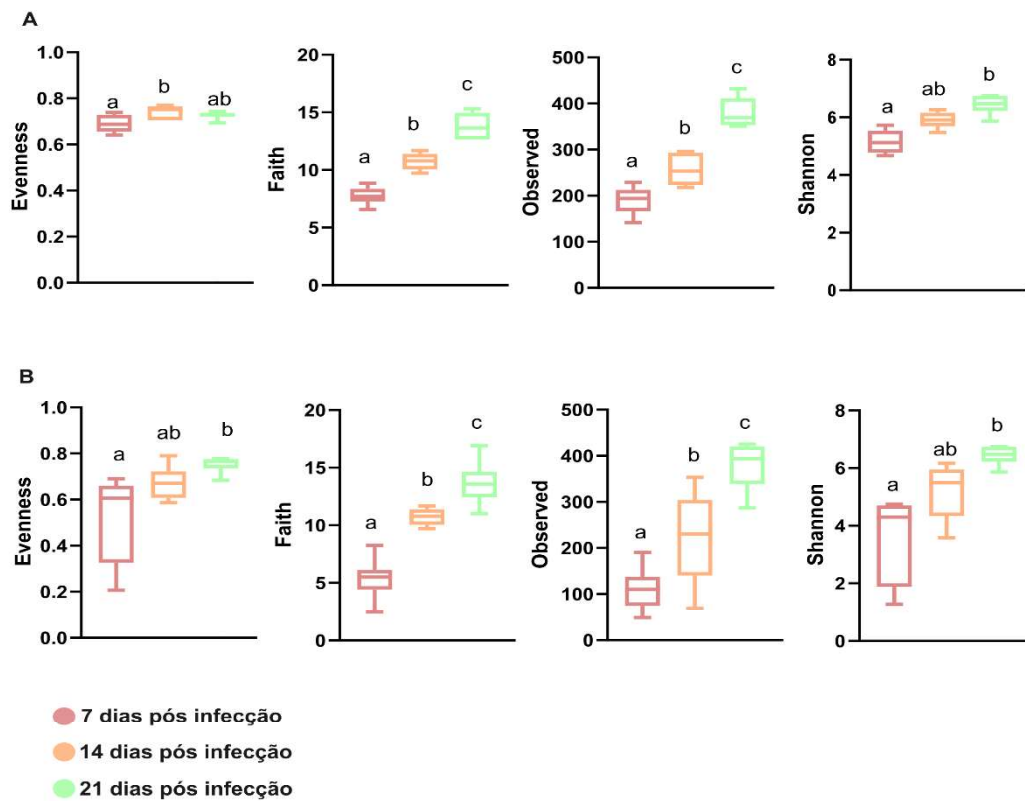


Figura 10: Análise da diversidade alfa dos índices de Evenness, Faith, Observed, Shannon, nas diferentes doses ao longo do tempo. (A) análises das amostras em 10x a dose vacinal (B) análise das amostras em 20x a dose vacinal.

A comparação entre o grupo controle e as duas doses vacinais foi realizada em cada um dos dias avaliados. Aos 7 dpi (Figura 11A), a equitabilidade microbiana, avaliada pelo índice de Evenness, não apresentou diferenças significativas entre os grupos analisados, com maior equitabilidade em 10x a dose, seguidos pelo controle e 20x a dose. A diversidade filogenética, avaliada pelo índice de Faith, apresentou diferença significativa entre as doses vacinais 10x e 20x ($p\text{-valor} = 0,007$), com menor valor de diversidade filogenética pra 20x a dose, e maior em 10x a dose. Diferença significativa entre esses mesmos tratamentos também foi observada no índice de Shannon ($p\text{-valor} = 0,009$), onde 10x a dose apresentou maior diversidade, seguido do controle e 20x a dose. A riqueza microbiana, avaliada pelo índice

Observed, apresentou valores muito próximos do controle e o 10x a dose, e 20x a dose mostrou o menor valor de riqueza. Houve diferença significativa no índice *Observed* entre o grupo controle e o tratamento com 20x ($p\text{-valor} = 0,01$), bem como entre os tratamentos com 20x e 10x ($p\text{-valor} = 0,002$).

Aos 14 dpi (Figura 11B), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em nenhum dos índices analisados, indicando similaridade na riqueza, equitabilidade e diversidade microbiana entre os tratamentos nesse período. Para a análise do índice de Evenness, o valor do grupo controle e 10x a dose com mesmo valor de equitabilidade, e 20x a dose com uma equitabilidade menor. O mesmo ocorreu no índice Faith, o grupo controle e 10x tiveram o mesmo valor, assim, mesma diversidade filogenética, e 20x a dose com menor valor de diversidade filogenética.

Aos 21 dpi (Figura 11C), a equitabilidade microbiana, avaliada pelo índice de Evenness, apresentou diferença significativa entre as doses vacinais 10x e 20x ($p\text{-valor} = 0,01$). A diversidade filogenética, avaliada pelo índice de Faith, e a riqueza microbiana, avaliada pelo índice *Observed*, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos analisados. Por outro lado, a diversidade microbiana, avaliada pelo índice de Shannon, diferiu significativamente entre o grupo controle e o tratamento com 10x ($p\text{-valor} = 0,03$).

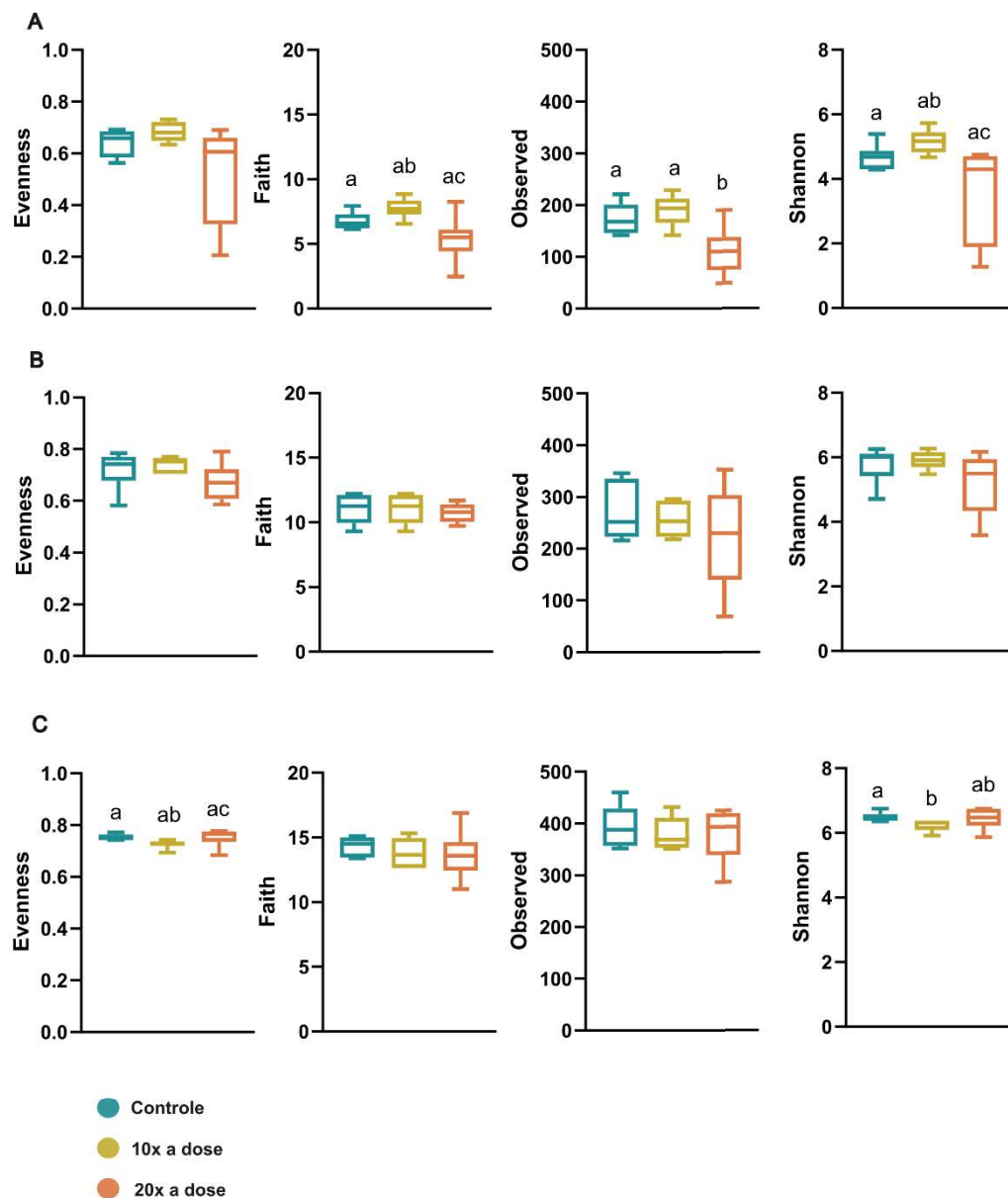


Figura 11: Análise da diversidade alfa dos índices de Evenness, Faith, *Observed*, Shannon, nos diferentes tempos de análise 7, 14, 21 dpi. (A) análises das amostras 7 dpi (B) análise das amostras 14 dpi (C) análise das amostras 21 dpi.

3.3.2 Beta-diversidade

A beta diversidade foi utilizada para calcular a matriz de dissimilaridade entre os grupos controle, 10x e 20x da dose em cada período avaliado. Aos 7 dias pós-infecção (dpi) (Figura 12), a comunidade microbiana apresentou diferenças significativas entre os grupos controle, 10x e 20x ($F = 3,44$; $p = 0,042$). As comparações pareadas indicaram diferenças entre 10x e 20x ($p = 0,022$) e entre controle e 10x ($p = 0,035$), enquanto não houve diferença significativa

entre 20x e controle ($p = 0,392$). Aos 14 dpi (Figura 13), não foi observada dispersão significativa da comunidade microbiana entre os grupos analisados. A análise por PERMANOVA confirmou a ausência de diferença global entre os grupos ($F = 0,033$; $p = 0,972$), e, conseqüentemente, as comparações pareadas também não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,5$). Aos 21 dpi (Figura 14), as comparações pareadas evidenciaram diferença significativa na composição microbiana entre o grupo 10x e o grupo controle ($p = 0,027$). Por outro lado, o grupo 20x não diferiu significativamente nem do controle nem do grupo 10x ($p \geq 0,5$). A ausência de diferença significativa na composição microbiana entre alguns grupos pode estar relacionada à variação intragrupo, conforme indicado pela análise de PERMANOVA ($F = 1,964$; $p = 0,171$).

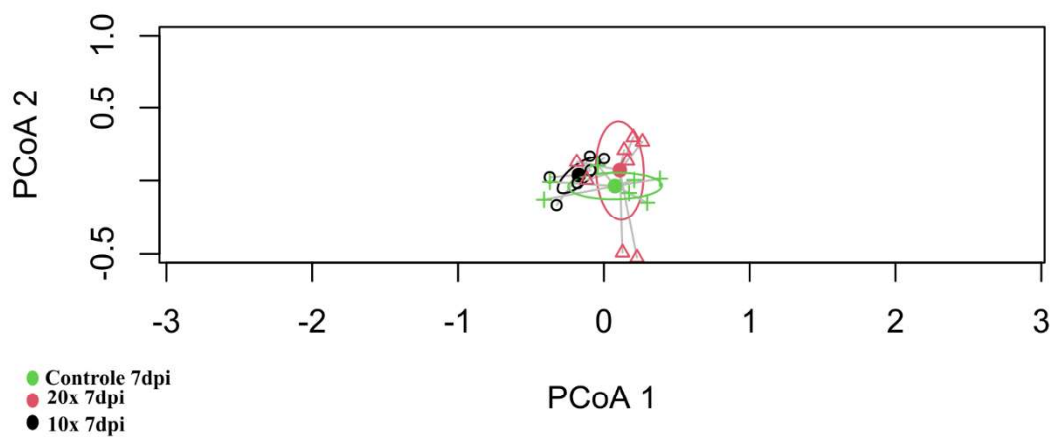


Figura 12: Beta diversidade das comunidades microbianas nos diferentes grupos experimentais controle, 10x e 20x a dose em 7dpi. A análise foi baseada em distâncias de dissimilaridade Bray-Curtis, e as diferenças entre grupos foram avaliadas por PERMANOVA com 999 permutações. Valores significativos nas comparações pareadas entre grupos e tempos estão indicados com asteriscos ($p - valor < 0,05$).

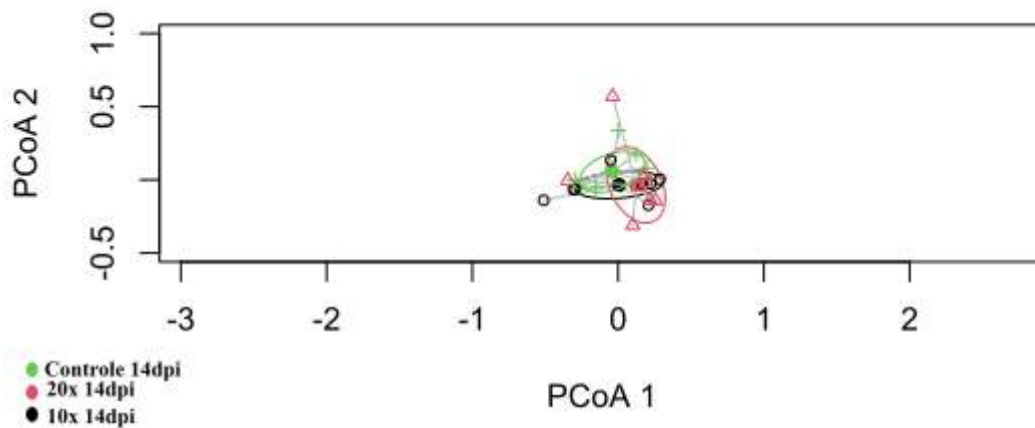


Figura 13: Beta diversidade das comunidades microbianas nos diferentes grupos experimentais controle, 10x e 20x a dose em 14dpi. A análise foi baseada em distâncias de dissimilaridade Bray-Curtis, e as diferenças entre grupos foram avaliadas por PERMANOVA com 999 permutações. Valores significativos nas comparações pareadas entre grupos e tempos estão indicados com asteriscos ($p\text{-valor} < 0,05$).

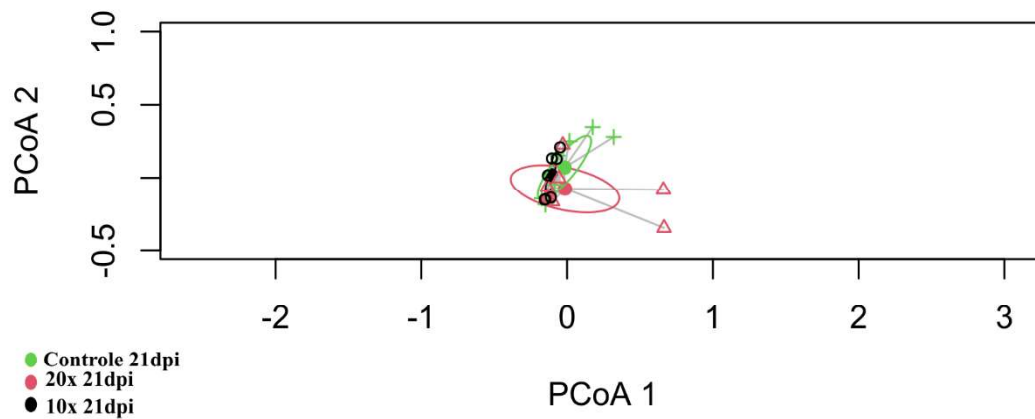


Figura 14: Beta diversidade das comunidades microbianas nos diferentes grupos experimentais controle, 10x e 20x a dose em 21dpi. A análise foi baseada em distâncias de dissimilaridade Bray-Curtis, e as diferenças entre grupos foram avaliadas por PERMANOVA com 999 permutações. Valores significativos nas comparações pareadas entre grupos e tempos estão indicados com asteriscos ($p\text{-valor} < 0,05$).

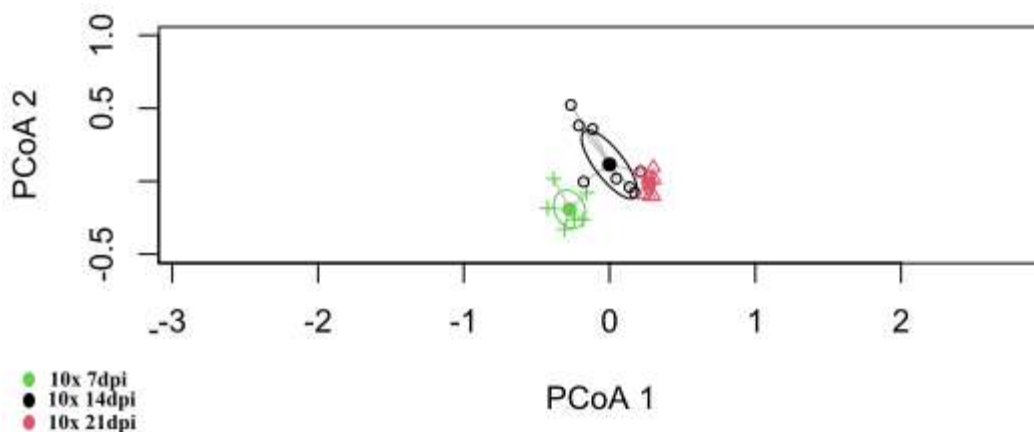


Figura 15: Beta diversidade das comunidades microbianas nos diferentes grupos experimentais 7, 14 e 21 dpi em 10x a dose. A análise foi baseada em distâncias de dissimilaridade Bray-Curtis, e as diferenças entre grupos foram avaliadas por PERMANOVA com 999 permutações. Valores significativos nas comparações pareadas entre grupos e tempos estão indicados com asteriscos ($p\text{-valor} < 0,05$).

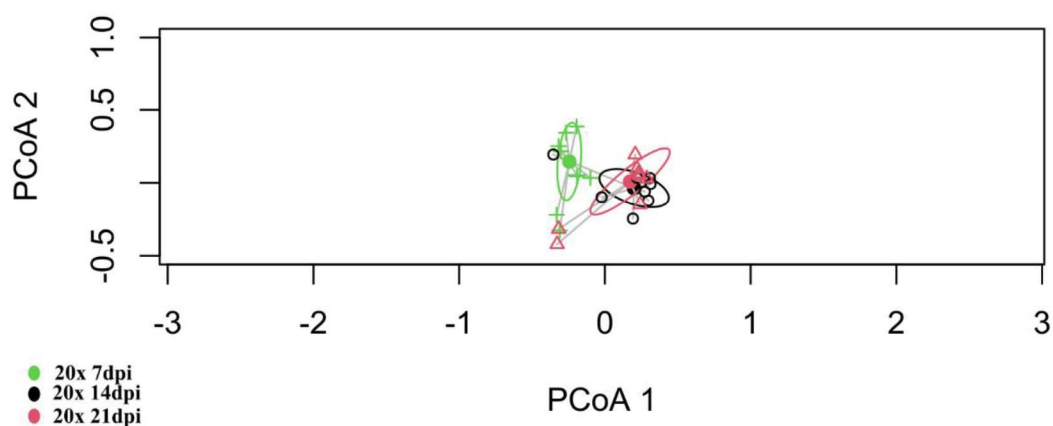


Figura 16: Beta diversidade das comunidades microbianas nos diferentes grupos experimentais 7, 14 e 21 dpi em 20x a dose. A análise foi baseada em distâncias de dissimilaridade Bray-Curtis, e as diferenças entre grupos foram avaliadas por PERMANOVA com 999 permutações. Valores significativos nas comparações pareadas entre grupos e tempos estão indicados com asteriscos ($p\text{-valor} < 0,05$).

As mesmas análises foram realizadas para avaliar as mudanças na composição microbiana ao longo do tempo. O grupo desafiado com 10x a dose (Figura 15) apresentou diferença significativa entre os tempos avaliados pelo teste de PERMANOVA ($F = 3,206$; $p_{75} =$

0,047). As comparações pareadas evidenciaram diferenças na estrutura da microbiota entre 14 e 21 dias pós-infecção (dpi) ($p = 0,031$) e entre 7 e 21 dpi ($p = 0,017$), indicando modulação temporal da comunidade microbiana nesse grupo. Em contraste, o grupo desafiado com 20x a dose (Figura 16) manteve a dispersão da composição microbiana relativamente estável ao longo do período experimental ($F = 0,822$; $p = 0,47$). A análise por PERMANOVA indicou maior variabilidade intragrupo, e as comparações pareadas entre 7, 14 e 21 dpi não revelaram diferenças significativas na composição microbiana ($p \geq 0,5$).

4. DISCUSSÃO

A composição e a diversidade da microbiota intestinal são amplamente reconhecidas como fatores determinantes para a saúde intestinal de frangos, especialmente durante infecções por *Eimeria* spp. (MACDONALD et al., 2017; WANG et al., 2019; HAMILTON et al., 2020; ZHOU et al., 2020; LIN et al., 2023; CAMPOS et al., 2024; DU et al., 2024). Nesse contexto, as alterações no microbioma ao longo da infecção, associadas à intensidade do desafio parasitário, podem explicar a dinâmica da resposta da microbiota intestinal frente ao agente infeccioso. Assim, a análise das mudanças na composição e na diversidade microbiana em diferentes doses de desafio e em distintos dias pós-infecção permite aprofundar a compreensão das interações entre a infecção por *Eimeria* spp. e a microbiota intestinal, contribuindo para uma visão mais integrada dos mecanismos envolvidos na patogênese e na recuperação intestinal.

As comunidades bacterianas variam consideravelmente conforme a localização ao longo do trato gastrointestinal das aves. Entre os diferentes segmentos, o ceco se destaca por apresentar maior abundância e diversidade bacteriana. Por essa razão, a maior parte das informações detalhadas sobre a microbiota intestinal de frangos concentra-se nessa região (OAKLEY et al., 2014; POURABEDIN; ZHAO, 2015; GONG et al., 2022).

Nesse contexto, a análise da composição taxonômica do conteúdo cecal por meio de diagrama de Venn revelou um aumento gradual no número de táxons compartilhados entre os tratamentos e o grupo controle, bem como entre as diferentes doses ao longo do tempo. Esse achado indica que, apesar do desafio por *Eimeria* spp., a comunidade bacteriana tende a se tornar mais homogênea entre os grupos à medida que o tempo avança. Embora o número total de ASVs tenha permanecido relativamente estável entre os tratamentos, observou-se uma redução temporária de aproximadamente 10 táxons no grupo 10x aos 14 dpi, sugerindo que essa dose pode promover alterações transitórias na estrutura microbiana.

De modo geral, a análise da composição cecal demonstrou que Firmicutes foi o filo predominante em todos os tratamentos, seguido por Bacteroidota, Proteobacteria, Verrucomicrobiota e Actinobacteriota. Esse padrão está de acordo com observações prévias em frangos, reforçando que Firmicutes constitui a base da microbiota cecal (POURABEDIN e ZHAO, 2015; JESSEBA et al., 2022; GRAHAM et al., 2023). Entretanto, diferentemente do relatado por JESSEBA et al. (2022), que avaliaram infecção isolada por *E. maxima* e observaram predominância de Proteobacteria aos 7 dpi, no presente estudo *Firmicutes* manteve-se como filo dominante. Esse resultado sugere que o desafio por *Eimeria* spp. pode modular a estrutura inicial da microbiota cecal de maneira distinta daquela observada em infecções isoladas. No grupo desafiado com 20x a dose, verificou-se uma redução temporária na abundância de *Firmicutes* aos 14 dpi, com retorno aos níveis médios aos 21 dpi. Essa variação indica que cargas parasitárias elevadas podem induzir um desequilíbrio transitório na microbiota cecal em fases mais tardias da infecção, possivelmente em decorrência das lesões na mucosa intestinal, que comprometem a digestão e favorecem o desenvolvimento da doença clínica (MADLALA et al., 2021).

Por outro lado, *Bacteroidota* não foi detectado aos 7 dpi nos grupos desafiados, apresentando maior abundância aos 14 dpi no grupo 20x. De acordo com FENG et al. (2023), que avaliaram a microbiota intestinal ao longo do tempo, o filo *Bacteroidota* apresenta aumento de abundância por volta dos 14 dias de vida das aves. Além disso, alguns gêneros pertencentes a esse filo podem proliferar ao longo do tempo e associar-se a efeitos potencialmente patogênicos na microbiota, impactando negativamente a eficiência alimentar, especialmente em condições de infecção (VIEIRA et al., 2020). A ausência de *Bacteroidota* aos 7 dpi nos grupos desafiados sugere que a fase aguda da infecção promoveu redução acentuada desse filo, o qual está frequentemente associado à degradação de polissacarídeos complexos e à geração de metabólitos fermentativos, incluindo AGCC, no ecossistema intestinal (THOMAS et al., 2011). Dessa forma, sua não detecção nesse período pode refletir uma alteração abrupta do ambiente intestinal, possivelmente decorrente de inflamação, modificação na disponibilidade de substratos e instalação de disbiose intestinal (OAKLEY et al., 2014; KOGUT, 2019).

O filo Proteobacteria apresentou maior abundância aos 7 dpi, com redução progressiva até os 21 dpi em todos os grupos experimentais. Esse filo inclui bactérias fermentativas envolvidas na produção de energia a partir de proteínas, mas também abrange ampla variedade de microrganismos potencialmente patogênicos. Assim, a diminuição de sua abundância relativa ao longo do tempo pode indicar que, aos 21 dpi, os frangos apresentam um ambiente intestinal mais estável e saudável (DAI et al., 2018; CHOI et al., 2023). Os filos

Verrucomicrobiota e Actinobacteriota foram detectados apenas aos 14 e 21 dpi, sugerindo uma colonização mais tardia, possivelmente associada à maturação da microbiota cecal. A abundância de Verrucomicrobiota variou conforme a dose de desafio, indicando que tanto o tempo quanto a intensidade da infecção modulam sua presença, o que pode estar relacionado a mecanismos de reorganização e restauração do equilíbrio microbiano. Por sua vez, o filo Actinobacteriota manteve-se pouco representativo (<1%) ao longo do período experimental, sugerindo participação quantitativamente limitada na composição da microbiota de frangos. Ainda assim, sua presença nos períodos mais tardios pode refletir processos de adaptação e maior estabilidade da comunidade microbiana intestinal, indicando possível papel funcional na consolidação do microbioma após o desafio infeccioso.

Aos 7 dias pós-infecção (dpi), a análise da abundância dos táxons revelou que a microbiota cecal foi predominantemente composta por Lachnospiraceae, *Ruminococcus*, *Escherichia_Shigella* e *Lactobacillus*. Em contrapartida, gêneros como *Alistipes*, *Tuzzerella*, *Gordonibacter* e *Subdoligranulum* apresentaram baixa abundância, indicando que a comunidade microbiana ainda se encontrava em fase de maturação. A reduzida presença de *Alistipes* pode comprometer a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e a conversão de ácidos biliares, impactando negativamente a digestão, bem como a modulação da inflamação e do estresse oxidativo (LONG et al., 2024; LI et al., 2025). De forma semelhante, a menor abundância de *Tuzzerella* pode afetar a disponibilidade de glutamina, prejudicando a integridade da mucosa intestinal, a manutenção do pH e a síntese de mucina, o que possivelmente contribui para maior ativação da resposta inflamatória intestinal (CHEN et al., 2024; SELLE et al., 2024; CHAGNEAU et al., 2025). A diminuição de *Gordonibacter* pode indicar um ambiente intestinal mais oxidativo, associado a maior vulnerabilidade da mucosa (KONG et al., 2022). Já a baixa presença de *Subdoligranulum* reforça o perfil de imaturidade da microbiota, considerando seu papel protetor na saúde intestinal de aves e mamíferos (WESIERSKA et al., 2025). Esse conjunto de alterações pode estar relacionado à maior susceptibilidade inicial ao desafio por *Eimeria* spp., bem como às respostas inflamatórias desencadeadas durante o período inicial da infecção (GONG et al., 2019; XUE et al., 2025).

Ao longo do tempo, alguns táxons apresentaram variações importantes na abundância relativa. *Eubacterium notatum* aumentou progressivamente, atingindo seu pico aos 21 dpi. *Streptococcus*, por sua vez, apresentou maior abundância aos 14 dpi, com redução subsequente, enquanto *Shuttleworthia* também demonstrou aumento gradual até os 21 dpi. Esses padrões indicam que a microbiota cecal encontra-se em constante adaptação, com sucessivas substituições e reorganizações de táxons à medida que o ecossistema intestinal amadurece. Tal

dinâmica pode modular interações metabólicas e imunológicas no hospedeiro, refletindo processos de ajuste funcional da comunidade microbiana (MENG et al., 2025). A presença consistente de *Lactobacillus* em todos os tempos e tratamentos reforça seu papel estabilizador da microbiota e modulador do sistema imunológico das aves. Esse gênero é reconhecido por estimular citocinas pró-inflamatórias e por atuar na resposta ao desafio parasitário, contribuindo para o equilíbrio entre ativação imune e manutenção da homeostase intestinal (KIM et al., 2015; VIEIRA et al., 2020; JESSEBA et al., 2022).

Adicionalmente, deve-se considerar que, conforme as exigências nutricionais do frango ao longo do desenvolvimento, houve alteração da dieta do sétimo para o oitavo dia de vida. Essa mudança foi caracterizada pelo aumento da energia metabolizável e redução da proteína bruta, fator que, segundo a literatura, pode influenciar a composição da microbiota intestinal (DE CESARE et al., 2019). Mathlouthi et al. (2022) observaram que a substituição de dietas à base de milho por formulações com trigo ou cevada resulta em aumento da abundância de *Lactobacillus*, o que não foi verificado no presente estudo. Cabe destacar que, neste experimento, o ingrediente utilizado para incremento energético foi o milho. Mesmo com o aumento da energia metabolizável, o gênero *Lactobacillus* manteve elevada abundância aos 7, 14 e 21 dpi, sugerindo estabilidade funcional frente às alterações dietéticas e ao desafio parasitário. Em estudo que avaliou o incremento de 7% da proteína bruta da exigência de alimentação do animal, verificou-se que o filo Proteobacteria foi influenciado tanto pela dieta quanto pelo tempo (DE CESARE et al., 2019). De forma semelhante, os resultados aqui apresentados demonstraram maior abundância relativa de Proteobacteria no período com maior disponibilidade de proteína bruta, seguida de redução progressiva ao longo do tempo, reforçando a interação entre fatores nutricionais e dinâmica microbiana.

A análise da abundância relativa indicou ausência de um efeito dose–resposta evidente entre os grupos desafiados por *Eimeria* spp. Ambos os tratamentos apresentaram predominância de táxons fermentadores e associados à manutenção da homeostase intestinal, como *Ruminococcus*, *Lachnospiraceae*, *Eubacterium* e *Clostridia*, embora diferenças sutis tenham sido observadas entre as doses. O grupo 10x apresentou maior abundância de *Lactobacillus* e *Alistipes*, concomitantemente à menor representação de táxons oportunistas, sugerindo um perfil microbiano mais equilibrado e possivelmente maior resistência à infecção, favorecendo a recuperação das aves (JESSEBA et al., 2022). Em contrapartida, no grupo 20x, apesar da predominância de táxons fermentadores, observou-se redução de *Alistipes* e aumento de Enterobacteriaceae, grupo frequentemente associado a maior risco de infecção e inflamação tecidual (YIN et al., 2025; MESA-PINEDA et al., 2021). Além disso, a abundância relativa de

gêneros como *Shuttleworthia* e *Tuzzerella* foi superior no tratamento 10x em comparação ao 20x, indicando que a dose mais elevada pode ter intensificado o processo inflamatório, comprometendo a manutenção de gêneros benéficos envolvidos na modulação da resposta imunológica e na integridade da função intestinal (TIAM et al., 2025). De forma geral, diferentemente do esperado, a maior dose não resultou em disbiose proporcionalmente mais acentuada da microbiota intestinal, demonstrando que o impacto do desafio por *Eimeria* spp. não foi estritamente dose-dependente, mas provavelmente influenciado pela interação entre intensidade do desafio, tempo pós-infecção e capacidade adaptativa da microbiota.

A análise da alfa diversidade revelou alterações significativas na microbiota intestinal ao longo do tempo em ambas as doses (10x e 20x), evidenciando uma reorganização gradual da comunidade microbiana, conforme descrito por Gong et al. (2019). Em contraste, McDonald et al. (2017), ao avaliarem frangos infectados por *E. tenella* com diferentes graus de lesão na mucosa intestinal, não observaram alterações na alfa diversidade, mesmo nos casos de lesões mais severas, resultado semelhante ao relatado em estudos com infecção mista por *Eimeria* spp. (MARTYNOVA-VAN KLEY et al., 2012). Essas divergências sugerem que a alfa diversidade pode ser mais influenciada pelo tempo de avaliação do que pela carga parasitária ou pela espécie de *Eimeria* sp., estando possivelmente relacionada à capacidade de reorganização e adaptação da microbiota intestinal ao longo do desafio infeccioso. No entanto, aos 7 dpi, observou-se aumento da alfa diversidade no grupo desafiado com 10x a dose, enquanto no grupo 20x a diversidade apresentou valores inferiores em todos os índices analisados. Esse resultado pode estar associado ao fato de que a maior dose de *Eimeria* spp. intensifica o processo inflamatório, reduzindo determinados táxons sensíveis à inflamação, conforme discutido anteriormente.

Ao longo do tempo, também foi observada modulação na composição da microbiota cecal no grupo 10x, sendo que aos 21 dpi a estrutura microbiana apresentou dispersão em relação aos períodos de 7 e 14 dpi. Esse cenário sugere que os períodos iniciais de vida do frango constituem uma janela estratégica para a modulação da microbiota intestinal, corroborando os achados de Gong et al. (2019), que destacam essa fase como particularmente responsiva a intervenções capazes de direcionar a microbiota. Adicionalmente, a fase inicial de vida coincidiu com o pico de infecção por *Eimeria* spp., o que pode ter contribuído para maior diferenciação entre os grupos experimentais. Aos 7 dpi, os grupos 10x e 20x apresentaram dispersão na composição microbiana entre si. Por outro lado, aos 21 dpi, apenas o grupo 10x diferiu significativamente do controle. Segundo Stanley et al. (2014b), a presença ou ausência de *Eimeria* sp. promove alterações mais pronunciadas na estrutura das comunidades microbianas, conforme análise pelo método UniFrac. Esses achados reforçam a hipótese de que

a dose de *Eimeria* spp. exerce maior impacto sobre a estrutura da comunidade microbiana nos períodos iniciais de vida do frango, uma vez que aves jovens podem apresentar infecção mais intensa devido às particularidades do desenvolvimento intestinal (KO et al., 2025).

De forma geral, as análises realizadas para compreender a abundância, a composição e a dinâmica da microbiota cecal em frangos desafiados com diferentes doses de *Eimeria* spp. ao longo do tempo fornecem subsídios importantes para a adoção de estratégias mais direcionadas, visando à melhoria da saúde intestinal e do desempenho produtivo das aves.

5. CONCLUSÃO

A microbiota cecal de frangos foi modulada principalmente pelo tempo pós-infecção, com aumento progressivo da riqueza, equidade e diversidade até os 21 dias pós-infecção, refletindo o processo de maturação da comunidade intestinal. As diferentes doses de *Eimeria* spp. exerceram efeitos pontuais sobre o microbioma, sem evidenciar um padrão claramente dose-dependente. No entanto, a menor dose de oocistos vacinais esteve associada a menor desequilíbrio da microbiota, caracterizado por maior abundância de táxons relacionados à homeostase intestinal, como *Lactobacillus* e *Alistipes*, e menor representação de grupos oportunistas. Por outro lado, a dose mais elevada associou-se à redução de táxons potencialmente benéficos e ao aumento de grupos frequentemente vinculados à disbiose e à inflamação intestinal, como *Enterobacteriaceae*, indicando maior comprometimento da estabilidade microbiana cecal. Esses resultados indicam que a modulação da microbiota intestinal foi determinada principalmente pelo tempo pós-infecção, enquanto o efeito da dose ocorreu de forma mais discreta, sem evidência de resposta proporcional sobre a estabilidade da microbiota intestinal de frangos desafiados com *Eimeria* spp.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BLAKE, D.P. et al. Re-calculating the cost of coccidiosis in chickens. *Veterinary Research*, v. 51, p. 115–129, 2020. DOI: 10.1186/s13567-020-00837-2.

CALLAHAN, B.J. et al. DADA2: High-Resolution Sample Inference from Illumina Amplicon Data. *Nat. Methods*, 13, 581–583, 2016.

CAMPOS, P.M. et al. Effects of *Eimeria acervulina* infection on the luminal and mucosal microbiota of the cecum and ileum in broiler chickens. *Scientific Reports*, v. 14, n. 1, p. 10702,

2024. DOI: 10.1038/s41598-024-61299-6.

CAPORASO, J. Gregory et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010.

CHEN, Y. et al. Disrupted *Tuzzerella* abundance and impaired L-glutamine levels induce Treg accumulation in ovarian endometriosis: a comprehensive multi-omics analysis. *Metabolomics*, v. 20, n. 2, p. 32, 2024. DOI: 10.1007/s11306-023-02072-0.

CHEN, C. et al. Effects of plant essential oils on intestinal microflora and growth performance of Lingshan native hens. *Poultry Science*, v. 104, p. 105539, 2025. DOI: 10.1016/j.psj.2025.105539.

CHEN, P. et al. Exploring the interaction between *Eimeria* spp. infection and the host: understanding intestinal barrier function dynamics. *Veterinary Quarterly*, v. 45, n. 1, p. 1–22, 2025. DOI: 10.1080/01652176.2025.2452169.

CHOI, S.; KIM, E. B. A comprehensive longitudinal study of gut microbiota dynamic changes in laying hens at four growth stages prior to egg production. *Animal Bioscience*, v. 36, n. 11, p. 1727, 2023. DOI: 10.5713/ab.23.0271.

DE CESARE, A et al. Effect of a low protein diet on chicken ceca microbiome and productive performances. *Poult Sci.* 2019 Sep 1;98(9):3963-3976. doi: 10.3382/ps/pez132.

DERYABIN, D. et al. Broiler chicken cecal microbiome and poultry farming productivity: a meta-analysis. *Microorganisms*, v. 12, p. 747, 2024. DOI: 10.3390/microorganisms12040747.

Dixon, Philip. 2003. “VEGAN, A Package of R Functions for Community Ecology.” *Journal of Vegetation Science* 14:927–30. <https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2003.tb02228.x>

DU, S. et al. Susceptibility and cecal microbiota alteration to *Eimeria* infection in Yellow-feathered broilers, Arbor Acres broilers and Lohmann pink layers. *Poultry Science*, v. 103, n. 7, p. 103824, 2024. DOI: 10.1016/j.psj.2024.103824.

EL-SHALL, N. A. et al. Phytochemical control of poultry coccidiosis: a review. *Poultry Science*, v. 101, p. 101542, 2022. DOI: 10.1016/j.psj.2021.101542.

FAITH, Daniel P. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological*

conservation, v. 61, n. 1, p. 1-10, 1992.

FENG, Y. et al. Quantitative microbiome profiling reveals the developmental trajectory of the chicken gut microbiota and its connection to host metabolism. *iMeta*, v. 2, n. 2, e105, 2023. DOI: 10.1002/imt2.105.

GONG, Y. et al. Early intervention with cecal fermentation broth regulates the colonization and development of gut microbiota in broiler chickens. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 1422, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01422.

GRAHAM, D. et al. Assessing the effects of a mixed *Eimeria* spp. challenge on performance, intestinal integrity, and the gut microbiome of broiler chickens. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 10, p. 1224647, 2023. DOI: 10.3389/fvets.2023.1224647.

HAMILTON, M. et al. Influence of *Eimeria* spp. infection on chicken jejunal microbiota and the efficacy of two alternative products against the infection. *Avian Diseases*, v. 64, n. 2, p. 123–129, 2020. DOI: 10.1637/0005-2086-64.2.123.

GONG, J. et al. Molecular analysis of bacterial populations in the ileum of broiler chickens and comparison with bacteria in the cecum. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 41, n. 3, p. 171–179, 2002. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2002.tb00978.x.

Ko H, Choi J, Goo D, Cervantes HM, Kim WK. Dose-dependent contribution of *Eimeria tenella* to *Salmonella* infection in broilers: impacts on growth, immunity, and cecal microbiota. *Poult Sci*. 2025 Dec;104(12):105958. doi: 10.1016/j.psj.2025.105958.

KOGUT, M. H. The effect of microbiome modulation on the intestinal health of poultry. *Animal Feed Science and Technology*, v. 250, p. 32–40, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.10.008>

KONG, L. et al. Glycerol monolaurate attenuated immunological stress and intestinal mucosal injury by regulating the gut microbiota and activating AMPK/Nrf2 signaling pathway in lipopolysaccharide-challenged broilers. *Animal Nutrition*, v. 10, p. 347–359, 2022. DOI: 10.1016/j.aninu.2022.06.005.

LÓPEZ-OSORIO, S.; CHAPARRO-GUTIÉRREZ, J. J.; GÓMEZ-OSORIO, L. M. Overview of poultry *Eimeria* life cycle and host–parasite interactions. *Frontiers in Veterinary Science*, v.

7, art. 384, 2020. DOI: 10.3389/fvets.2020.00384.

LI, D. et al. *Lactiplantibacillus plantarum* FRT4 protects against fatty liver hemorrhage syndrome: regulating gut microbiota and FoxO/TLR-4/NF- κ B signaling pathway in laying hens. *Microbiome*, v. 13, n. 1, art. 88, 2025. DOI: 10.1186/s40168-025-02083-0.

LI, T. et al. Free-caged rearing modes regulate chicken intestinal metabolism by influencing gut microbial homeostasis. *Poultry Science*, v. 104, n. 1, art. 104381, 2025. DOI: 10.1016/j.psj.2024.104381.

LIN, Y.; LOURENCO, J. M.; OLUKOSI, O. A. Effects of xylanase, protease, and xylo-oligosaccharides on growth performance, nutrient utilization, short chain fatty acids, and microbiota in *Eimeria*-challenged broiler chickens fed high fiber diet. *Animal Nutrition*, v. 15, p. 430–442, 2023. DOI: 10.1016/j.aninu.2023.08.009.

LIU, X.; et al. Age-associated changes in the growth development of abdominal fat and their correlations with cecal gut microbiota in broiler chickens. *Poultry Science*, v. 102, n. 9, art. 102900, 2023. DOI: 10.1016/J.aninu.2020.11.019.

LONG, X. et al. The chicken cecal microbiome alters bile acids and riboflavin metabolism that correlate with intramuscular fat content. *Frontiers in Microbiology*, v. 15, art. 1494139, 2024. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1494139.

LOPEZ-OSORIO, S.; CHAPARRO-GUTIÉRREZ, J. J.; GÓMEZ-OSORIO, L. M. Overview of poultry *Eimeria* life cycle and host–parasite interactions. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 7, art. 384, 2020. DOI: 10.3389/fvets.2020.00384.

MACDONALD, S. E. et al. Effects of *Eimeria tenella* infection on chicken caecal microbiome diversity, exploring variation associated with severity of pathology. *PLoS One*, v. 12, n. 9, e0184890, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0184890.

MADLALA, T.; OKPEKU, M.; ADELEKE, M. A. Understanding the interactions between *Eimeria* infection and gut microbiota, towards the control of chicken coccidiosis: a review. *Parasite*, v. 28, art. 48, 2021. DOI: 10.1051/parasite/2021047.

MARTYNOVA-VAN KLEY, M. A. et al. Effect of *Eimeria* infection on cecal microbiome of broilers fed essential oils. *International Journal of Poultry Science*, v. 11, n. 12, p. 747–755,

2012. DOI: 10.3923/ijps.2012.747.755.

MATHLOUTHI, Nejib et al. Effects of xylanase and β -glucanase addition on performance, nutrient digestibility, and physico-chemical conditions in the small intestine contents and caecal microflora of broiler chickens fed a wheat and barley-based diet. *Animal Research*, v. 51, n. 05, p. 395-406, 2002.

MENG, J. X. et al. Temporal variability in the diversity, function and resistome landscapes in the gut microbiome of broilers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 292, art. 117976, 2025. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2025.117976.

MESA-PINEDA, C. et al. Chicken coccidiosis: from the parasite lifecycle to control of the disease. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 8, art. 787653, 2021. DOI: 10.3389/fvets.2021.787653.

OAKLEY, B. B. et al. The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiology Letters*, v. 360, n. 2, p. 100–112, 2014. DOI: 10.1111/1574-6968.12608.

POURABEDIN, M.; ZHAO, X. Prebiotics and gut microbiota in chickens. *FEMS Microbiology Letters*, v. 362, n. 15, fnv122, 2015. DOI: 10.1093/femsle/fnv122.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, v. 41, p. D590–D596, 2013. DOI: 10.1093/nar/gks1219.

ROSTAGNO HS et al. 2017. Tabelas brasileiras para aves e suínos: Composição dos alimentos e exigências nutricionais. Viçosa: UFV. p. 483.

SELLE, P.H. et al. The potential of glutamine supplementation in reduced-crude protein diets for chicken-meat production. *Animal Nutrition*, v. 18, p. 49–56, 2024. DOI: 10.1016/j.aninu.2024.03.017.

SHANG, Y. et al. Chicken gut microbiota: importance and detection technology. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 5, art. 254, 2018. DOI: 10.3389/fvets.2018.00254.

THOMAS, F. et al. Environmental and gut Bacteroidetes: the food connection. *Frontiers in Microbiology*, v. 2, art. 93, 2011. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00093>

TIAN, X. et al. Effects of purple corn anthocyanin on slaughter performance, immune function, the caecal microbiota and the transcriptome in chickens. *Poultry Science*, v. 104, n. 6, art. 105104, 2025. DOI: 10.1016/j.psj.2025.105104.

WANG, X. et al. Effects of *Bacillus subtilis* and coccidial vaccination on cecal microbial diversity and composition of *Eimeria*-challenged male broilers. *Poultry Science*, v. 98, n. 9, p. 3839–3849, 2019. DOI: 10.3382/ps/pez096.

WEŚSIERSKA, E. et al. Changes in the intestinal microbiota of broiler chicken induced by dietary supplementation of the diatomite-bentonite mixture. *BMC Veterinary Research*, v. 21, n. 1, art. 13, 2025. DOI: 10.1186/s12917-024-04439-4.

XUE, N. et al. Comparison of gut microbiome profile of chickens infected with three *Eimeria* species reveals new insights on pathogenicity of avian coccidia. *Microorganisms*, v. 13, n. 12, art. 2752, 2025. DOI: 10.3390/microorganisms13122752.

YIN, Q. et al. Ecological dynamics of Enterobacteriaceae in the human gut microbiome across global populations. *Nature Microbiology*, v. 10, n. 2, p. 541–553, 2025. DOI: 10.1038/s41564-024-01912-6.

ZHOU, B.H. et al. Effects of *Eimeria tenella* infection on the barrier damage and microbiota diversity of chicken cecum. *Poultry Science*, v. 99, n. 3, p. 1297–1305, 2020. DOI: 10.1016/j.psj.2019.10.073.

7. CONCLUSÃO GERAL

Diferentes doses de *Eimeria* spp. influenciam a expressão gênica relacionada à integridade intestinal e à resposta imune em frangos, determinando a intensidade da infecção e o processo de recuperação. Doses elevadas causam maior desregulação da barreira intestinal e respostas imunes mais intensas, impactando negativamente a saúde e o desempenho produtivo das aves. Esses achados ressaltam a necessidade de estratégias ajustadas de manejo e controle da coccidiose para proteger a saúde intestinal e otimizar a produtividade na avicultura.

A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na resposta ao desafio por *Eimeria* permite o desenvolvimento de intervenções mais eficazes, como vacinas e protocolos de manejo, que possam minimizar os efeitos da infecção. Assim, o controle eficiente da coccidiose contribui diretamente para a sustentabilidade e lucratividade da

avicultura, promovendo a saúde e o bem-estar das aves.

8. ANEXOS

8.1 Etapa de purificação dos amplicons

A purificação dos produtos dos amplicons da PCR foi realizada utilizando beads magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter), conforme protocolo do fabricante. Inicialmente, a placa contendo os produtos da PCR foi centrifugada a 1.000g por 1 minuto a 20 °C para concentrar o volume no fundo dos poços. As beads AMPure XP foram previamente equilibradas à temperatura ambiente e homogeneizadas em vortex por 30 segundos. Foram adicionados 20 µL de beads AMPure XP a cada poço contendo 25 µL do produto de PCR, seguido de homogeneização por pipetagem (10 vezes) ou agitação a 1800 rpm por 2 minutos. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos para ligação do DNA às partículas magnéticas. A placa foi posicionada em suporte magnético por 2 minutos, até completa clarificação do sobrenadante, que foi então cuidadosamente removido e descartado. Procederam-se duas lavagens consecutivas com 200 µL de etanol 80% recém-preparado, mantendo a placa no suporte magnético, com incubação de 30 segundos em cada lavagem. Após a segunda lavagem, o etanol residual foi removido e as beads foram mantidas em secagem ao ar por 10 minutos. Em seguida, a placa foi removida do suporte magnético e adicionaram-se 52,5 µL de tampão Tris 10 mM (pH 8,5) para eluição do DNA. Após homogeneização e incubação à temperatura ambiente por 2 minutos, a placa foi novamente posicionada no suporte magnético por 2 minutos. Por fim, 50 µL do sobrenadante contendo o DNA purificado foram transferidos para uma nova placa de PCR, sendo armazenados a -15 °C a -25 °C até a realização da etapa subsequente.

8.2 Etapa de purificação do Index

A purificação final da biblioteca, após PCR do INDEX, foi realizada utilizando beads magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter), com o objetivo de remover fragmentos inespecíficos, primers residuais e componentes da reação antes da etapa de quantificação. Inicialmente, a placa contendo os produtos da Index PCR foi centrifugada a $280 \times g$ por 1 minuto a 20 °C para concentrar o volume no fundo dos poços. As beads AMPure XP foram previamente equilibradas à temperatura ambiente e homogeneizadas em vortex por 30 segundos. Foram adicionados 56 µL de beads AMPure XP a cada poço contendo o produto da Index PCR, seguidos de homogeneização por pipetagem (10 vezes) ou agitação a 1800 rpm por

2 minutos. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos para permitir a ligação do DNA às partículas magnéticas. A placa foi posicionada em suporte magnético por 2 minutos, até completa clarificação do sobrenadante, que foi cuidadosamente removido e descartado. Realizaram-se duas lavagens consecutivas com 200 µL de etanol 80% recém-preparado, mantendo a placa no suporte magnético, com incubação de 30 segundos em cada lavagem. Após a segunda lavagem, o etanol residual foi removido cuidadosamente, e as beads permaneceram em secagem ao ar por 10 minutos. Em seguida, a placa foi retirada do suporte magnético e adicionaram-se 27,5 µL de tampão Tris 10 mM (pH 8,5) para eluição do DNA. Após homogeneização completa das beads e incubação à temperatura ambiente por 2 minutos, a placa foi novamente posicionada no suporte magnético por 2 minutos. Por fim, 25 µL do sobrenadante contendo a biblioteca purificada foram transferidos para uma nova placa de PCR, sendo armazenados a -15 °C a -25 °C até a etapa de quantificação, normalização e agrupamento da biblioteca.

8.3 Tabela com o processamento de dados pelo programa DADA2 após etapa de denoising

Tabela 1. Resumo do processamento de dados pelo DADA2 após denoising.

Amostr a	Leitur as		%		Leitur as		%	
	de entrad a	Leitur as filtrad as	Leituras passaram pelo filtro		as após denois ing	Leituras mesclad as	Leitura s mescla das	Leituras não- quiméri cas
			84.2		23170			
2C	276867	233164	2	233060	3	83.69	231581	83.64
			84.4					
3C	90553	76435	1	76379	76044	83.98	73807	81.51
			84.2		13579			
4C	162279	136660	1	136539	9	83.68	135666	83.6
			84.1		25135			
5C	301187	253382	3	253276	9	83.46	250963	83.32
			84.4		48854			
6C	581788	491464	7	491256	9	83.97	487137	83.73
7C	141663	119291	84.2	119206	11842	83.6	118355	83.55

			1		5			
			84.0		35819			
8C	428134	360002	9	359808	8	83.66	358055	83.63
			84.1					
9C	52520	44203	6	44122	43775	83.35	43704	83.21
10C	54952	46104	83.9	46048	45849	83.43	45816	83.37
			84.1		15855			
11C	189407	159385	5	159229	5	83.71	158149	83.5
			84.1					
12C	113612	95640	8	95528	95099	83.71	94088	82.82
			83.8		14937			
13C	179886	150881	8	150575	0	83.04	149187	82.93
			81.3					
14C	41302	33596	4	33536	33344	80.73	32486	78.65
			83.6		14605			
15C	175676	146931	4	146791	8	83.14	145910	83.06
			83.8		18037			
16C	216444	181429	2	181330	6	83.34	179636	82.99
			80.7		14466			
17C	180399	145720	8	145577	8	80.19	142144	78.79
			83.4		30831			
18C	371969	310557	9	310170	8	82.89	306340	82.36
			84.2					
19C	64890	54677	6	54486	54054	83.3	53905	83.07
			83.4		22366			
20C	269838	225185	5	225019	2	82.89	219455	81.33
			77.1		16449			
21C	214418	165412	4	165233	7	76.72	160988	75.08
			84.3					
22C	103722	87449	1	87300	86896	83.78	86269	83.17
			82.3		36888			
23C	450733	371108	3	370789	4	81.84	365275	81.04
1_10x	287210	241654	84.1	241512	24051	83.74	238620	83.08

			4		9			
			84.6		20021			
2_10x	237799	201312	6	201160	6	84.2	195500	82.21
			83.9		11268			
4_10x	135173	113523	8	113395	9	83.37	111204	82.27
			84.5		26302			
5_10x	312688	264473	8	264333	3	84.12	262723	84.02
			84.3		17114			
7_10x	204170	172246	6	172116	0	83.82	170752	83.63
			83.8					
8_10x	80506	67474	1	67400	66928	83.13	66236	82.27
			84.1					
9_10x	71527	60204	7	60125	59902	83.75	59790	83.59
10_10			84.1					
x	42609	35837	1	35723	35505	83.33	35447	83.19
11_10			84.0		17801			
x	212771	178917	9	178761	6	83.67	172449	81.05
12_10			82.4		23690			
x	288971	238177	2	238004	4	81.98	233272	80.73
13_10			84.1					
x	75006	63125	6	63050	62800	83.73	62738	83.64
14_10			83.6					
x	114707	95919	2	95749	95304	83.08	94683	82.54
15_10			84.2					
x	10113	8517	2	8462	8337	82.44	8280	81.87
16_10			67.4					
x	144517	97446	3	97390	97047	67.15	96897	67.05
17_10			82.4		31013			
x	378073	311787	7	311561	9	82.03	299854	79.31
18_10			72.7		16799			
x	232809	169332	3	169177	8	72.16	167310	71.87
19_10			79.9		21990			
x	276559	221177	7	220983	0	79.51	213630	77.25

21_10			84.0		26201			
x	313393	263373	4	263210	4	83.61	261718	83.51
22_10			80.7		22302			
x	277537	224110	5	223952	9	80.36	222438	80.15
23_10			78.8		20137			
x	256727	202419	5	202268	3	78.44	193949	75.55
24_10			77.3		20254			
x	263570	203978	9	203654	4	76.85	201737	76.54
1_20x	161571	136447	84.4	136348	13572	84	135179	83.67
			5		2			
2_20x	332902	279950	84.0	279914	27899	83.81	278912	83.78
			9		9			
3_20x	373803	314641	84.1	314502	31267	83.65	312129	83.5
			7		9			
4_20x	219004	184668	84.3	184583	18344	83.76	183367	83.73
			2		7			
5_20x	225442	189468	84.0	189398	18876	83.73	188693	83.7
			4		4			
6_20x	583480	492144	84.3	492012	48933	83.86	488949	83.8
			5		4			
7_20x	216694	181930	83.9	181826	18104	83.55	180860	83.46
			6		6			
8_20x	285545	241117	84.4	240990	24003	84.06	239877	84.01
			4		2			
9_20x	330392	277576	84.0	277374	27594	83.52	258890	78.36
			1		9			
10_20	90979	76917	84.5	76846	76569	84.16	76512	84.1
x			4					
11_20	90091	75809	84.1	75736	75419	83.71	75355	83.64
x			5					
12_20	292533	246738	84.3	246495	24522	83.83	234391	80.12
x			5		2			
13_20	244046	205548	84.2	205369	20450	83.8	204304	83.72

x			3		5			
14_20	334206	265704	79.5	265523	26400	78.99	244395	73.13
x					4			
15_20	38334	32203	84.0	32105	31905	83.23	31739	82.8
x			1					
16_20	62414	50085	80.2	50063	49924	79.99	49924	79.99
x			5					
17_20	296890	249903	84.1	249699	24843	83.68	248076	83.56
x			7		9			
18_20	296705	248043	83.6	247838	24681	83.18	243044	81.91
x					0			
19_20	1006	792	78.7	730	695	69.09	669	66.5
x			3					
20_20	294222	245838	83.5	245709	24442	83.07	242666	82.48
x			6		2			
21_20	286208	224339	78.3	224108	22311	77.96	216411	75.61
x			8		4			
22_20	360152	298891	82.9	298539	29655	82.34	295072	81.93
x			9		1			
23_20	283160	237894	84.0	237571	23644	83.5	232055	81.95
x			1		3			
24_20	10953	9211	84.1	9202	9159	83.62	9134	83.39
x								

Legenda: C (controle); 10x (10 x a dose vacinal); 20x (20 x a dose vacinal).