

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**

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

**TESE**

**Anátomo-Clínica e Biologia em Frangos de Corte  
Experimentalmente Infectados com *Eimeria*  
*acervulina* e Suplementados com Betaína**

**Marcel Teixeira**

**2007**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS  
SANIDADE ANIMAL**

**ANÁTOMO-CLÍNICA E BIOLOGIA EM FRANGOS DE CORTE  
EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Eimeria acervulina* E  
SUPLEMENTADOS COM BETAÍNA**

**MARCEL TEIXEIRA**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Carlos Wilson Gomes Lopes**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias, Área de concentração em Sanidade Animal.

Seropédica, RJ  
Março de 2007

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

**MARCEL TEIXEIRA**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.

TESE APROVADA EM 28/02/2007

---

Carlos Wilson Gomes Lopes. PhD, LD, UFRRJ  
(Orientador)

---

Paulo Soares da Costa. PhD, MAPA/SIF

---

Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira. PhD, UENF

---

Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho. DSc., UENF

---

Virgínia Léo de Almeida Pereira. DSc., UFF

***“O que é verdadeiramente imoral é ter desistido de si mesmo”***

Clarice Lispector

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho aos meus pais, Celso e Maria José, pelo amor, carinho e incentivo.*

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Em especial ao professor Carlos Wilson Gomes Lopes, pelos anos de orientação, dedicação e, sobretudo amizade. Aos colegas de trabalho, por todo apoio, paciência e companheirismo, em especial a Walter Leira Teixeira Filho que não mediu esforços em prestar seu suporte técnico durante a execução deste trabalho, e Walter Flausino e Paulo Roberto de Carvalho Filho, pelo apoio e amizade.

Agradeço também pelo suporte e orientação técnica do professor Doutor Ivan Barbosa Machado Sampaio - Universidade Federal de Minas Gerais, professor Doutor Augusto Vidal da Costa Gomes e Tânia Márcia Soares Niang - Departamento de Nutrição Animal e Pastagens da UFRRJ, professora Doutora Cristiane Hess de Azevedo Meleiro - Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFRRJ, professora Doutora Rosane Nora Castro – Departamento de Química da UFRRJ, professora Doutora Glória Maria Direito – Departamento de Microbiologia Veterinária da UFRRJ, Doutor Carlos Fagonde da Costa - Embrapa Suínos e Aves, e a Eli Baldez Siqueira – Departamento de Química da UFRRJ.

Aos meus pais, irmãos, amigos e familiares, pelo apoio e incentivo.

A DEUS, mais que a vida, permitiu que chegasse até aqui.

## BIOGRAFIA

**MARCEL TEIXEIRA**, segundo filho de Celso da Silva Teixeira e Maria José Henrique Teixeira, brasileiro, nasceu em 22 de julho de 1976 na cidade de Volta Redonda, no estado do Rio de Janeiro.

Iniciou sua formação profissional em 1991, ingressando no Colégio Técnico Agrícola Nilo Peçanha da Universidade Federal Fluminense, onde se diplomou em Técnico em Agropecuária no ano de 1994. Em 1996, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Foi estagiário pelo SINTEEG e Bolsista de Iniciação Científica pelo PIBIC (CNPq/UFRRJ) de meados do ano de 1998 até 2002, no Laboratório de Coccídios e Coccidioses do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária. Durante todo esse período foi orientado pelo Professor Doutor Carlos Wilson Gomes Lopes principalmente na área de morfologia e biologia das espécies do gênero *Eimeria* parasitas de aves.

Após graduar-se como Médico Veterinário em fevereiro de 2002, ingressou no Mestrado do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, obtendo em setembro de 2003 o título de Mestre em Ciências Veterinárias com concentração em Parasitologia Veterinária. Naquele momento optou pelo programa de Pós-Graduação Integrada do CNPq, passando imediatamente a fazer parte do corpo de alunos do curso de Doutorado em Ciências Veterinárias, agora com concentração em Sanidade Animal. Sua atuação profissional permanece na área de biologia e morfologia de *Eimeria*, bem como patologia e controle alternativo da coccidiose aviária.

## RESUMO

TEIXEIRA, Marcel. **Anátomo-Clínica e Biologia em Frangos de Corte Experimentalmente Infectados com *Eimeria acervulina* e Suplementados com Betaína.** 2007. 60p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

Um estudo foi realizado com o objetivo de se avaliar a anátomo-clínica e a biologia em frangos de corte experimentalmente infectados com *Eimeria acervulina* e suplementados com betaína. Para tanto 390 pintos de corte Cobb foram alojados em baterias metálicas num delineamento experimental em blocos ao acaso constituído de cinco tratamentos e seis repetições com treze aves, incluindo-se um controle positivo, um grupo tratado com salinomicina e penicilina G potássica e mais três níveis de betaína na ração sendo estes 0,05%, 0,10% e 0,15%. A dieta era composta de uma mistura de milho e soja elaborada conforme as exigências de frangos de corte, sendo água e comida fornecidos *ad libitum*. Aos 14 dias de vida as aves foram infectadas individualmente por via oral com  $2 \times 10^5$  oocistos esporulados de *E. acervulina*. A seguir, nos períodos de 0-7 e 7-14 dias após a infecção (DAI), foram determinados o ganho de peso, consumo de ração, produção de oocistos, nível de proteínas plasmáticas e observados sinais clínicos. Necropsias foram realizadas no 0, 4°, 7° e 14° DAI, sendo uma ave de cada repetição eutanasiada para realização do escore de lesão, coleta de sangue e de tecido intestinal para histopatologia e mensuração das vilosidades intestinais. A análise laboratorial e preparo dos oocistos foi realizada através da técnica de centrifugação em solução saturada de açúcar seguida de contagem por grama de fezes e mensuração com ocular micrométrica. A biologia do parasito foi avaliada através do tempo de esporulação, período pré-patente, período patente da infecção, morfometria de fases endógenas e oocistos e a relação com a constante matemática Phi. Não foi observada diferença ( $p > 0,05$ ) anátomo-clínica nas aves dos diferentes tratamentos utilizados em relação a todos os parâmetros utilizados, no entanto a resposta com a betaína foi semelhante a do tratamento com salinomicina e penicilina G potássica, indicando que há possibilidade de ser utilizada em substituição a este medicamento. Ainda, a betaína demonstrou capacidade de limitar a produção de oocistos frente ao grupo controle, porém num nível inferior a salinomicina. Quanto à biologia do parasito, embora a betaína fosse capaz de exercer influência sob o formato e o tamanho dos oocistos e esporocistos, pouca influência foi exercida nos estágios endógenos com base na mensuração de trofozoítos e macrogametas. Através da morfologia foi possível se observar uma grande relação entre o desenvolvimento dos esporocistos de *E. acervulina* e a constante matemática Phi.

Palavras chave: *Eimeria acervulina*, betaína, frangos de corte, infecção experimental, Phi.



## ABSTRACT

TEIXEIRA, Marcel. **Anatomy-clinics and Biology in Broilers Chicks Experimentally infected with *Eimeria acervulina* and supplemented with betaine.** 2007. 60p. Thesis (Doctor of Science in Veterinary Science, Animal Health). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

Purposing to evaluate the anatomy-clinics and biology in broilers chicks experimentally infected with *Eimeria acervulina* and supplemented with betaine, a study was carried out. Thus, 390 broiler chicks Cobb were housed in battery cages distributed in a randomized block design composed of five treatments, six replicates with 13 chicks each, including a positive control, a group treated with the salinomycin plus potassium penicillin G and three levels of betaine in the feed 0.05%, 0.10% and 0.15%. A soybean-maize based diet was prepared according the nutritional requirements of broiler chickens; food and water were given *ad libitum*. Chicks 14 days old were individually infected orally with  $2 \times 10^5$  sporulated oocysts of *E. acervulina*. Weight gain, feed consumption, oocyst output and clinical signs were performed during 1-7 and 7-14 days after inoculation (DAI). After, from 0-7 and 7-14 DAI weight gain, feed consumption, oocyst output, plasma proteins and clinical signs were evaluated. At 0, 4, 7 and 14 DAI one bird from each replicate were euthanatized to perform lesion score and collection of blood and intestinal tissues for histopathology and villous measuring. Laboratorial analyses were made using saturated sugar centrifugation technique following oocyst counting and measurements with an ocular micrometric. Biology of the parasite was evaluated throughout the sporulation time, pre-patent and paten periods of infection, morphology of endogenous stages and oocyst and relationship with the mathematical constant Phi. It was not observed anatomy-clinics differences ( $p > 0.05$ ) between birds of different treatments due to all parameters used, however the response with betaine was similar to treatment with salinomycin and potassium penicillin G, indicating there are possibilities to use betaine to substitute these drugs. Nevertheless, betaine show ability to decrease oocyst output against control group but fewer than salinomycin. Regarding the biology of the parasite, although betaine affected the form and size of oocysts, little influence was observed in the endogenous stages according to measurements of trophozoites and macrogametes. Within the morphology it was observed a great relationship between the development of sporocysts of *E. acervulina* and the mathematical constant Phi.

Keywords: *Eimeria acervulina*, betaine, broiler chickens, experimental infection, Phi.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1.</b> Estrutura química da betaína	12
<b>Figura 2.</b> Transmetilação da betaína no ciclo da metionina	14
<b>Figura 3.</b> Câmara de Neubauer	21
<b>Figura 4.</b> Inoculação das aves no 14° dia de vida	21
<b>Figura 5.</b> Curva padrão para a determinação da concentração das proteínas plasmáticas totais	23
<b>Figura 6.</b> Corte histológico do duodeno de frangos de corte. Altura de vilo (AV) e Profundidade de cripta (PC). HE, 40X	25
<b>Figura 7.</b> Produção de oocistos de <i>Eimeria acervulina</i> durante a infecção experimental. T1) Salinomicina + promotor de produção; T2) controle positivo; T3) betaína 0,05%; T4) betaína 0,10%; T5) betaína 0,15%	31
<b>Figura 8.</b> Duodeno de frangos de corte. Lesões por <i>Eimeria acervulina</i> (?) pontuadas em +1 (lesões dispersas) A; +2 (lesões agrupadas) B e +3 (lesões coalescentes) C	33
<b>Figura 9.</b> Formas endógenas de <i>Eimeria acervulina</i> no duodeno de frangos de corte no 7° dia após a infecção, T2. A) trofozoítos, B) pequenos merontes. HE, (escala= 10µm)	35
<b>Figura 10.</b> Duodeno de frangos de corte. Lesão caracterizada por fusão e encurtamento das vilosidades (?) no 14° dia após a infecção, T5. HE, 40X	35
<b>Figura 11.</b> Formas endógenas de <i>Eimeria acervulina</i> no duodeno de frangos de corte no 7° dia após a infecção, T2. Setas brancas (zigotos), setas pretas (oocistos imaturos). HE, (escala= 10µm)	36

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1.</b> Consumo de ração e ganho de peso de frangos de corte de 1-7 e 7-14 dias após a infecção com <i>Eimeria acervulina</i>	28
<b>Tabela 2.</b> Níveis de proteínas plasmáticas em frangos de corte infectados experimentalmente com <i>Eimeria acervulina</i>	29
<b>Tabela 3.</b> Valores médios do escore de lesões em frangos de corte experimentalmente infectados com <i>Eimeria acervulina</i>	32
<b>Tabela 4.</b> Valores médios de altura de vilosidades, profundidade de cripta e relação cripta/vilo do intestino de frangos de corte	37

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1.</b> Tempo de esporulação dos oocistos de <i>Eimeria acervulina</i>	46
<b>Tabela 2.</b> Tabela 2. Eliminação diária de oocistos por grama de fezes durante o período experimental com <i>Eimeria acervulina</i>	47
<b>Tabela 3.</b> Morfologia dos estágios evolutivos de <i>Eimeria acervulina</i>	48
<b>Tabela 4.</b> Valores médios obtidos de diversas variáveis da morfologia de <i>Eimeria acervulina</i> e suas razões matemáticas	49

## **LISTA DE QUADROS**

### **CAPÍTULO I**

**Quadro 1.** Composição da dieta basal de frangos de corte

19

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	01
<b>CAPÍTULO I. ANATOMO-CLÍNICA EM FRANGOS DE CORTE EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM <i>Eimeria acervulina</i> E SUPLEMENTADOS COM BETAÍNA.</b>	02
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	03
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	04
2.1 O Parasito	04
2.1.1 Classificação	04
2.1.2 Biologia	04
2.1.3 Patogenia	05
2.1.4 Fisiopatologia da Coccidiose	06
2.2 Modulação da Coccidiose Através da Dieta	07
2.2.1 Modulação da microbiota intestinal	08
2.2.2 Modulação da capacidade de resposta animal	10
2.3 Betaína	11
2.3.1 Estrutura química e metabolismo	12
2.3.2 Fundamentos da aplicação da betaína em dietas animais	14
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	18
3.1 Animais e Instalações	18
3.2 Alimentação e Grupos Experimentais	18
3.3 Preparo do Material Infectante e Inoculação	20
3.4 Avaliação de Parâmetros Clínicos	22
3.5 Patologia	24
3.6 Material Fotográfico	26
3.7 Análise Estatística	26
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	27
4.1 Parâmetros Clínicos	27
4.1.1 Consumo de ração e ganho de peso	27
4.1.2 Proteínas plasmáticas totais	28
4.1.3 Produção de Oocistos	30
4.2 Patologia	32
4.2.1 Escore de Lesões	32
4.2.2 Histopatologia	34
4.2.3 Morfologia das vilosidades intestinais	36
<b>CAPÍTULO II. BIOLOGIA DE <i>Eimeria acervulina</i> EM FRANGOS DE CORTE EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS E SUPLEMENTADOS COM BETAÍNA</b>	37
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	38
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	39
2.1 Biologia dos Estágios Evolutivos em <i>Eimeria</i>	40
2.2 Influência da Betaína no Desenvolvimento e na Estrutura de Estágios Evolutivos de <i>Eimeria</i>	40
	41

2.3 A Sequência de Fibonacci, a Proporção Áurea e sua Aplicação Biológica	42
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	44
3.1 Tempo de Esporulação	44
3.2 Períodos Parasitológicos	44
3.3 Morfologia dos Estágios Evolutivos	44
3.4 Relacionando a Morfologia de <i>Eimeria acervulina</i> com Phi	45
3.5 Análise Estatística	45
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	46
4.1 Tempo de Esporulação	46
4.2 Períodos Parasitológicos	47
4.3 Morfologia dos Estágios Evolutivos	48
4.4 <i>Eimeria acervulina</i> e Phi	49
<b>CONCLUSÕES</b>	50
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	51

## INTRODUÇÃO GERAL

As aves domésticas podem ser afetadas por uma grande variedade de enfermidades entéricas responsáveis por perdas significativas para a produção e para a sanidade, entre estas a coccidiose. Seu controle ainda depende dos agentes antimicrobianos clássicos que durante muitas décadas vêm sendo a principal maneira de controle da doença e um dos responsáveis pela garantia do desempenho produtivo dos animais que impulsionaram o crescimento da atividade. No entanto, a crescente resistência a esses medicamentos tem estimulado a procura por novas estratégias de controle. Como parte deste esforço muitos produtos naturais têm sido testados, não só pela possibilidade de promoverem proteção e atuarem como moduladores na dieta como também pelo fato de atenderem a crescente preocupação da opinião pública mundial quanto ao uso de produtos químicos na alimentação animal.

Investigações recentes revelam que existem possibilidades de se prevenir desordens entéricas através de dietas funcionais (SMITS et al., 1999) através das quais, baseando-se no conhecimento da interação entre nutrição e saúde, formulações são produzidas para aliviar os efeitos adversos da infecção. Dentre estas, está atualmente disponível no mercado brasileiro produtos a base de betaína cuja utilização tem sido justificada principalmente devido ao controle osmótico a ela atribuído. Encontrar alternativas aos aditivos convencionais na avicultura, no entanto implica em desenvolver uma metodologia apropriada para se estimar as diferenças que podem acontecer sob condições de estresse e desafio à integridade da mucosa intestinal (BELLAYER et al., 2003). Neste contexto é que a primeira pesquisa brasileira com o uso da betaína delineada para avaliar o desempenho zootécnico de frangos de corte durante o desafio por *Eimeria acervulina*, foi proposta por NIANG (2005). Projeto este desenvolvido por uma equipe multidisciplinar que permitiu acrescentar outros questionamentos sobre a atuação desse aditivo dietético, tais como o seu efeito na resposta clínica e patologia do hospedeiro bem como na biologia do parasito. A partir daí diversos parâmetros da relação parasito-hospedeiro foram acessados com o intuito de se conhecer as alterações clínicas, patológicas e biológicas durante a suplementação com betaína em frangos de corte infectados experimentalmente com *Eimeria acervulina*, e cujos resultados serão apresentados a seguir.

## **CAPÍTULO I**

### **ANATOMO-CLÍNICA EM FRANGOS DE CORTE EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Eimeria acervulina* E SUPLEMENTADOS COM BETAÍNA**



## 1 INTRODUÇÃO

Os efeitos significativos da aplicação da betaína na alimentação animal e mais especificamente na nutrição avícola têm sido relatados desde meados dos anos 40 (ALMQUIST; GRAU, 1943). Conforme consta, os benefícios têm sido atribuídos a dois mecanismos metabólicos principais: ação como osmólito reduzindo a demanda energética para manutenção da água celular e o equilíbrio iônico; e ação como doadora de grupamentos metila para diversas reações de transmetilação que traz benefícios para o desempenho produtivo com menor custo de produção.

O efeito osmorregulador exercido pela betaína na mucosa intestinal baseia-se na manutenção desta delicada estrutura em momentos de estresse como o desafio pela coccidiose, durante o qual a diarreia e desidratação levam a interrupção da digestão e absorção de nutrientes por afetarem a atividade metabólica. Embora isso seja particularmente verdadeiro os resultados práticos observados até o momento têm sido um tanto controverso, levando a conclusão de que o conhecimento do uso da betaína é ainda incipiente, faltando maiores esclarecimentos principalmente nas questões da relação parasita-hospedeiro que envolve desde o desenvolvimento do parasito até o modo pelo qual ele afeta o hospedeiro.

Nesta parte do trabalho foi abordada a influência da betaína na anátomo-clínica de frangos de corte infectados experimentalmente com *E. acervulina* através da associação de dados clínicos com dados de desempenho.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O Parasito

Anton van Leeuwenhoek (1632-1723) surpreendeu o mundo científico através de suas declarações acerca de diversos microrganismos por ele observados, e segundo se afirma, teria este visto pela primeira vez estruturas de um coccídio na da bile de coelhos (WAGGONER, 2005). Em 1865, Lindemann denominou tal organismo como *Monocystis stiedae*, incluído em 1875 por Schneider no gênero *Eimeria* (HAMMOND; LONG, 1973). No entanto, até o século XIX, as espécies de coccídios que tinham oocistos tetraspóricos dizóicos encontrados em diversas aves eram conhecidas como *E. avium* Rivolta e Silvestrini, 1873 até a descrição de *Coccidium tenellum* Railliet e Lucent, 1891 nas fezes de pintos, posteriormente confirmada como sendo *E. tenella* Fanttan, 1909 (KAWAZOE, 2000). No entanto, os maiores esclarecimentos sobre a identificação e patogenicidade de espécies de coccídios de aves domésticas foram feitos por Tyzzer (1929), que relatou sobre diversas espécies do gênero *Eimeria* encontradas em galináceos como *E. acervulina*.

#### 2.1.1 Classificação

Várias classificações foram propostas desde a identificação das primeiras formas de protozoários, sendo a classificação apresentada por Corliss (1994) a mais aceita atualmente, onde se pode incluir a espécie de coccídio utilizada neste trabalho, a saber:

Império: **Eukariota** Cavalier-Smith, 1998  
Reino: **Protozoa** Goldfus, 1918 (Siebold, 1845)  
Filo: **Apicomplexa** Levine, 1970  
Classe: **Coccidia** Leukart, 1879  
Ordem: **Eucoccidiidae** Leger e Duboscq, 1910  
Subordem: **Eimeriina** Leger, 1911  
Família: **Eimeriidae** Minchin, 1903  
Gênero: ***Eimeria*** Schneider, 1875  
Espécie: ***E. acervulina*** Tyzzer, 1929

#### 2.1.2 Biologia

*Eimeria acervulina* é um microrganismo intracelular obrigatório, parasita de células epiteliais do intestino delgado de aves domésticas. Assim como todas as outras espécies do gênero possui um ciclo de vida monoxeno separado por três fases bem definidas: multiplicação assexuada ou merogonia; multiplicação sexuada ou gametogonia; e maturação ou esporulação no ambiente externo, conhecida como esporogonia.

O ciclo parasitário inicia-se quando os oocistos esporulados são ingeridos e recebem uma série de estímulos, iniciando-se pela ação mecânica exercida pela moela das aves. Em seguida inicia-se uma fase altamente dependente de ativação enzimática, conhecida como excitação. Sendo assim CO<sub>2</sub>, pH ácido, enzimas proteolíticas do suco pancreático (tripsinas e quimiotripsinas) e bile promovem ativação incrementando a permeabilidade da micrópila. A tripsina-quinase auxilia na destruição dos corpos de Stieda dos esporocistos e liberação dos esporozoítos (SOULSBY, 1987). Tais enzimas isoladamente não são capazes de promover a liberação dos esporozoítos devendo ocorrer secreção de enzimas próprias e internas no

esporocisto (DORAN, 1966a). Uma vez liberados os esporozoítos, agora móveis vão iniciar o processo de invasão celular. Tal processo é rápido, quase imediatamente a excitação podendo completar-se em poucos segundos (HAMMOND; LONG, 1973). Os esporozoítos invadem as células epiteliais do duodeno, podendo também penetrar na lâmina própria e ir até o epitélio glandular. Um maior número de esporozoítos está presente três horas após a infecção, estando 75% confinados ao epitélio das vilosidades e o restante na lâmina própria ou no interior de macrófagos (DORAN, 1966b).

Durante a invasão da célula hospedeira antígenos representados por organelas do complexo apical (roptrias e micronemas) executam um papel importante para o reconhecimento e penetração através da membrana da célula hospedeira e formam um vacúolo parasitóforo (LEVINE, 1985). Em seguida o esporozoíto no interior da célula toma forma arredondada passando a trofozoíto, é o início do processo de reprodução assexuada por esquizogonia, a merogonia. As formas endógenas assexuadas de *E. acervulina* se situam próximas ao núcleo da célula hospedeira, podendo em uma mesma célula encontrar-se mais de um parasito (SOULSBY, 1987). O núcleo do trofozoíto começa a se dividir e passa por uma diferenciação citoplásmica que dá origem aos merozoítos. Merontes maduros podem ser encontrados no terceiro dia da infecção (DAI), contendo em seu interior 16 a 32 merozoítos que tão logo rompem a célula hospedeira e penetram em outras células. Antes de se iniciar a fase gametogônica poderão ocorrer um ou mais ciclos assexuados, suspeitando-se que isso seja pré-determinado geneticamente. Segundo Fernando (1990), os merozoítos geralmente penetram nas células mais próximas daquelas donde emergiram, o que explica a ocorrência de áreas altamente parasitadas no intestino próximas a áreas não parasitadas.

A reprodução sexuada ou gametogonia inicia-se por volta do quarto DAI. Nesta etapa os merozoítos penetram nas células e desenvolvem-se em microgametas (gameta masculino) ou macrogametas (gameta feminino). Os microgametas são constituídos de vários microgametas, estruturas móveis originadas por um processo de divisão celular similar a esquizogonia, cada qual constituído de núcleo, mitocôndria e dois ou três flagelos. Os macrogametas não se dividem, constituem-se de uma célula única com núcleo central e uma série de estruturas arredondadas na periferia, chamados de corpos formadores de parede. Os microgametas deixam a célula para fecundarem os macrogametas formando assim um zigoto. Em torno do zigoto formar-se-á uma membrana a partir dos corpos formadores de parede, dando origem ao oocisto (*oo*= ovo, *cystis*= encistado) que se desprende da mucosa sendo eliminado com as fezes. O período pré-patente mínimo de *E. acervulina* é de 96 horas (MACDOUGALD; REID, 1987).

O oocisto é uma estrutura geralmente ovóide com parede dupla altamente resistente ao dessecação e diversas substâncias químicas, sendo por isso conhecido como a forma de resistência do ciclo de vida (SOUSLBY, 1987). Após sair da célula epitelial e ser eliminado nas fezes, sob condições ambientais adequadas passa por um processo de esporulação ou esporogonia. A meiose ocorre nesta fase e sendo assim todos os estágios seguintes do ciclo de vida, exceto pelo gameta feminino fecundado, possuirão um conteúdo haplóide no DNA (FERNANDO, 1990). Tal processo requer a presença de oxigênio e, no caso de *E. acervulina*, é no mínimo de 17 horas, variando com as condições de temperatura e umidade do ambiente (MACDOUGALD; REID, 1987). Ao final do processo cada oocisto esporulado contém quatro esporocistos cada qual com dois esporozoítos no seu interior.

### 2.1.3 Patogenia

De uma forma geral a coccidiose é a doença parasitária mais freqüente na avicultura industrial mundial sendo raro encontrar criações que não estejam sendo acometidas por alguma das espécies do gênero *Eimeria* (WILLIAMS, 2001). Apesar disso, a ocorrência da

doença nas suas formas clínicas, com alta mortalidade e perdas produtivas severas não é comum devido ao advento das drogas anticoccidianas comumente utilizadas nas explorações avícolas. Portanto, o mais comum de se observar atualmente é a ocorrência da coccidiose subclínica, caracterizada principalmente pela redução no ganho de peso e comprometimento na conversão alimentar.

Considerações isoladas a respeito da patogenicidade de *E. acervulina* vêm sendo feitas, e desde a sua descrição, passa de espécie causadora de inflamação crônica do intestino delgado até espécie de importância patogênica mínima, chegando nos últimos anos a ser considerada nas grandes explorações avícolas causadora de grandes perdas produtivas. Tal fato tem sido atribuído principalmente a sua alta capacidade reprodutiva ou proliferativa, pois cada oocisto de *E. acervulina* ingerido é potencialmente capaz de produzir milhares de novos indivíduos num curto espaço de tempo, o que contribui para um alto índice de contaminação ambiental que acarretará diretamente numa alta taxa de reinfecção. Sabe-se que é necessário um grande número de oocistos de *E. acervulina* para se produzir sintomas clínicos, sendo os mais comuns a anorexia, arrepiamento das penas, diarreia, fraqueza e o mau desenvolvimento (REID, 1975). A mortalidade é baixa mesmo em infecções severas sendo, portanto uma espécie mais mórbida do que letal, devendo ser avaliada com base nos dados do desempenho. De fato, o efeito total no hospedeiro estará na dependência da magnitude da dose inicial infectante de oocistos que determinam o número de células invadidas por esporozoítos, da disseminação da infecção no plantel, da imunidade dos animais, da presença de substâncias anticoccidianas na ração e do modo pela qual elas afetam o parasitismo (FAYER, 1980).

Caracteristicamente *E. acervulina* acomete a parte proximal do intestino delgado na região do duodeno. Pode também se desenvolver em outras regiões, e nos casos de infecções muito severas e com cepas patogênicas pode ser encontrada do duodeno ao reto (LONG et al., 1976). É raro se observar este coccídio nas regiões mais profundas da mucosa, estando em sua maioria confinados ao epitélio da parte superficial das vilosidades. Nas infecções brandas as lesões por *E. acervulina* estão associadas a faixas esbranquiçadas transversais ao eixo central do intestino delgado associadas à presença de oocistos e gametócitos nas vilosidades. As lesões podem ser vistas na serosa do duodeno, mas a reação tissular é normalmente reduzida. Em infecções mais graves, as lesões são como placas coalescentes e a parede da mucosa se encontra espessada, podendo se observar um aspecto hemorrágico (FERNANDO, 1990). Em infecções crônicas e duradouras acometendo aves de idade avançada o intestino se torna fino e friável perdendo o tônus muscular (LONG et al., 1976).

#### **2.1.4 Fisiopatologia da Coccidiose**

Parece simples de se entender que, de uma forma geral, o parasitismo intestinal pode afetar diretamente a absorção de nutrientes pelo hospedeiro. Também é considerável que uma vez comprometida esta absorção pelo trato digestivo, as funções metabólicas serão afetadas, o que traduz em prejuízos diretos para o hospedeiro e para sua produção. No entanto, os mecanismos envolvidos neste processo são bastante complexos, quase sempre relacionados com uma série de reações químicas e alterações fisiopatológicas que vão desde uma simples anorexia até alterações ao nível de organelas citoplasmáticas.

A coccidiose tem demonstrado capacidade de comprometer o desenvolvimento das aves domésticas. Tal decréscimo é seguido quase sempre de um período de maior crescimento correspondente a uma fase de restabelecimento. Como resultado, as aves se recuperam da infecção e se desenvolvem numa maior velocidade, o bastante para terminarem o ciclo produtivo com peso semelhante a aves que nunca tiveram infecção (TURK, 1974). Tal fato indica que o parasitismo, além de causar alterações, é capaz de induzir a uma série de mecanismos fisiológicos adaptativos compensatórios no organismo dos hospedeiros. A seguir

serão apresentados os principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos no parasitismo por *Eimeria* e as alterações adaptativas ocorridas durante o processo de infecção.

Os danos causados pela infecção por *Eimeria* no trato digestivo podem variar substancialmente sendo associados como distúrbios gerais, que se caracterizam por prejudicar o hospedeiro de uma forma sistêmica, e distúrbios locais ocasionados diretamente no local da infecção e ao longo do trato digestivo das aves. Entre os distúrbios gerais comumente observados estão a diminuição da ingestão de alimento e do ganho de peso, afetando os parâmetros produtivos (FERNANDO, 1970; TURK, 1974; RUFF, 1999; HOSTE, 2001). Tais efeitos podem aparecer em graus variados de acordo com a severidade da doença, não sendo uma particularidade do parasitismo por coccídios nas aves (COOP; KYRIAZAKIS, 1999).

Diretamente no local de predileção as formas endógenas parasitárias comumente causarão danos à estrutura da mucosa intestinal, nos níveis teciduais e intracelulares, e distúrbios nas funções entéricas. No intestino das aves o epitélio será particularmente afetado, sendo as principais lesões relacionadas à erosão de vilosidades, freqüentemente acompanhada de hiperplasia das criptas de Lieberkühn (TURK, 1974). Nas aves afetadas por *E. acervulina* os efeitos da infecção estão inicialmente confinados a porção do duodeno, onde poderá ser observado edema, reação inflamatória, espessamento da mucosa, aumento da taxa de renovação celular ou “turn over”, alterações do pH e decréscimo nos níveis de pigmentos carotenóides e de proteínas plasmáticas no sangue (FERNANDO; MCCRAW, 1973; RUFF et al., 1974; AUGUSTINE; RUFF, 1983; SOULSBY, 1987; MATTHEWS et al., 1997; HOSTE, 2001; MAIORKA et al., 2002a).

A infecção por *E. acervulina* é capaz de produzir alterações ao longo de todo o trato digestivo das aves. Allen (1984), avaliando as alterações no tubo digestivo durante a infecção por *E. acervulina*, observou aumento no comprimento dos seguimentos distais do intestino delgado (jejuno e íleo), associados ao aumento da umidade e peso do órgão fresco e a seco. Ao avaliar a atividade mitocondrial de enterócitos observou também um aumento no metabolismo celular, demonstrando que o intestino delgado infectado em áreas específicas é estimulado a passar por alterações adaptativas compensatórias, provavelmente para contrabalançar os efeitos na absorção de nutrientes durante a infecção. Contrariamente, no local parasitado o que se observa é que há comprometimento do metabolismo energético havendo redução na oxidação de glicose, de ácido octanóico e de  $\alpha$ -cetogluturato, fatos confirmados inclusive por microscopia eletrônica que revela uma grande destruição mitocondrial (ALLEN; DANFORTH, 1984).

Tantas mudanças culminam em conseqüências importantes, principalmente relacionadas ao transporte de nutrientes ao longo do trato digestivo. A depressão da capacidade absorptiva ou má absorção da mucosa tem sido mensurada para a maioria dos nutrientes. Turk (1974) ao relacionar as diversas espécies de *Eimeria* das aves com os respectivos locais de predileção, observou que na infecção por *E. acervulina* a absorção de zinco, ácido oléico e gorduras estão marcadamente reduzidas durante a fase aguda, enquanto o parasitismo do jejuno afeta principalmente a absorção de proteínas além do zinco. Ainda, segundo este o comprometimento nas demais regiões do intestino se limitaria a absorção do cálcio que por sua vez é absorvido em todas as partes do trato digestivo. Contudo, a magnitude destas e de outras mudanças estruturais e o modo pelo qual afetariam o hospedeiro estariam intimamente ligadas à intensidade da infecção pelos parasitos, cujo prejuízo só poderá ser acessado através de um ensaio experimental.

## **2.2 Modulação da Coccidiose Através da Dieta**

O interesse no controle alternativo da coccidiose tem sido bastante motivado recentemente devido aos constantes questionamentos ao controle exclusivo da doença por

meio de drogas anticoccidianas. Há que se considerar que esses medicamentos foram responsáveis por um grande desenvolvimento na avicultura industrial a partir de seu surgimento na década de 40, no entanto o recente aparecimento da resistência a estas drogas e a crescente preocupação da opinião pública com relação aos meios de produção tem levado as diversas restrições e aumentado substancialmente a busca por novos meios de controle da enfermidade. Investigações recentes na nutrição animal e humana indicam que existem oportunidades para se prevenir ou aliviar desordens entéricas mediante a aplicação de dietas funcionais (SMITS et al., 1999). A coccidiose aviária, sendo uma doença diretamente relacionada ao processo de digestão e absorção dos nutrientes, torna-se uma doença de grande desafio para o controle através da dieta. Muitas formulações foram estudadas e consideradas capazes de reduzir a severidade da coccidiose, algumas delas recomendadas mesmo antes do advento dos medicamentos anticoccidianos (BEACH; CORL, 1925; TYZZER, 1929; BECKER, 1937), época em que o principal meio de controle era baseado numa alimentação direcionada. A princípio pensava-se que o efeito dos alimentos estivesse ligado à presença ou ausência de algum nutriente indispensável ao desenvolvimento do parasito. Sabe-se hoje, no entanto que o efeito destes alimentos é devido às alterações na fisiologia e no metabolismo do trato intestinal como pH, motilidade, população de microrganismos e outros processos (COLNAGO, 1999). A seguir serão abordados alguns grupos de compostos destinados à modulação da coccidiose através da dieta, com atuação direta ou indireta no parasitismo.

### **2.2.1 Modulação da microbiota intestinal**

A colonização do trato digestivo por uma grande quantidade de bactérias é um fato normal nos homens e animais. Uma vez instalados na mucosa esses microrganismos passarão a compor a microbiota intestinal que futuramente, em decorrência de um estresse de qualquer natureza no hospedeiro, poderão ter seu processo de multiplicação acentuado. A presença de mais agentes patogênicos, tais como bactérias, ocasionam inflamação e espessamento da parede intestinal, reduzindo a eficiência e a capacidade de absorção, podendo dificultar ainda mais a recuperação dos animais acometidos pela infecção por *Eimeria*. Neste ponto o uso de alguns aditivos pode criar um ambiente desfavorável aos microrganismos tendendo a reduzir os impactos negativos e estabelecer um equilíbrio adequado da atividade microbiana no trato digestivo. Como resultado será possível a manutenção de uma série de fatores tais como a manutenção do metabolismo equilibrada, habilidade de reagir ao estresse da intensa pressão de produção, boa imunidade, desempenho reprodutivo e impacto ambiental reduzido (PIVA; ROSSI, 2005).

Trabalhos pioneiros no controle da coccidiose através da dieta indicaram há décadas uma ação dos alimentos no desenvolvimento da microbiota e sua influência na severidade da coccidiose. Os primeiros registros dessa informação foram feitos por Beach e Corl (1925), e posteriormente por Tyzzer (1929) e Becker (1937) que recomendaram a inclusão de derivados do leite como manteiga, leite em pó e soro de leite como forma de controle, afirmando reduzir a severidade da infecção por *E. tenella*. Mais recentemente, Koveit (1969) demonstrou que aves alimentadas com dietas semipurificadas com perfil nutricional idêntico ao de uma dieta a base de milho e farelo de soja tiveram uma clara diminuição na mortalidade por *E. tenella* em relação a aves alimentadas exclusivamente com a dieta de milho e farelo de soja. De forma semelhante Colnago et al. (1984) demonstraram que o uso de uma dieta semipurificada frente a uma dieta com base na mistura de milho-farelo de soja foi capaz de melhorar outros parâmetros tais como o ganho de peso, a conversão alimentar e o escore de lesão. Ainda, segundo estes autores a “proteção” dada pela dieta semipurificada parece funcionar apenas para *E. tenella*, uma vez que na infecção com mistura de espécies (*E. acervulina*, *E. brunetti* e *E. máxima*) parasitas do intestino delgado não se obteve diferenças significativas em nenhum

dos parâmetros citados anteriormente. Conforme Colnago et al. (1984), outros trabalhos indicam que a infecção por *E. tenella* é mais severa nas aves alimentadas com ração a base de trigo do que a base de milho, independente da presença do anticoccidiano. A principal explicação dada para tais efeitos durante a coccidiose cecal está na influência das espécies de microrganismos presentes no ceco.

A concepção de que o controle da microflora poderia trazer benefícios à produção de frangos de corte também levou ao uso de aditivos antimicrobianos conhecidos erroneamente como promotores de crescimento. Para efeito de controle da coccidiose, esses produtos também estariam atuando de forma indireta por afetarem os microrganismos causadores de infecção secundária. De acordo com a revisão de Cromwell (1999), existem muitos trabalhos demonstrando resultados positivos com o uso desses medicamentos para o desempenho das aves. Entretanto, com a atual preocupação de que estes aditivos possam induzir resistência a patógenos importantes para os seres humanos, muitos países estão limitando o uso, e determinando prazos para a não utilização definitiva dos mesmos na alimentação dos frangos.

Na substituição dos antibióticos sem finalidade terapêutica existem produtos comerciais bastante eficazes no controle da microbiota intestinal. Os ácidos orgânicos são substâncias químicas com estrutura semelhante aos aminoácidos e ácidos graxos de cadeia curta, e que parecem exercer um efeito similar aos antimicrobianos promotores de crescimento. Quando adicionados à ração, ácidos orgânicos como os ácidos fumárico e cítrico aceleram a acidificação do conteúdo intestinal atuando como uma barreira química contra diversos patógenos, além de permitirem a proliferação de microrganismos desejáveis tais como *Lactobacillus* spp (SMITIS, 1999). As razões que os fazem ter influência nutricional em frangos estão associadas à produção insuficiente de HCl para dietas de alta capacidade tampicante (alta proteína e macroelementos) e também devido à carga microbiana atuante sobre os animais (BELLAVÉR; SCHEUERMANN, 2004). Maiorka et al. (2002b), utilizando uma mistura de ácido fumárico (0,5%), ácido láctico (5,1%), ácido cítrico (5,4%) e ácido ascórbico (1,2%) na proporção de (0,05%) na dieta inicial de frangos de corte observou melhora na conversão alimentar até os sete dias de idade. Posteriormente Bellaver et al. (2003) testaram níveis de 0-1,6 de inclusão de uma mistura de ácido láctico (80%), ácido acético (10%) e ácido orto-fosfórico (10%) na dieta de frangos de corte que promoveu melhora no desempenho dos animais. Embora muito utilizados a eficácia dos ácidos orgânicos como aditivos na dieta tem sido intensamente questionada. Ao mesmo tempo em que algumas pesquisas apontam resultados positivos ou promissores, em outros estudos são observados resultados tão pobres no ganho de desempenho que colocaram em questão não mais sua efetividade e sim o aspecto de custo e benefício (DO VALE et al., 2004).

De uma forma mais distinta atuam os produtos de exclusão competitiva, os chamados pré e probióticos. O objetivo do tratamento com esses produtos é a prevenção da colonização do intestino das aves por patógenos indesejáveis mediante o estabelecimento de outros microrganismos. A prática da exclusão competitiva em operações comerciais é muito comum e embora não esteja direcionada ao controle da coccidiose pode oferecer benefícios indiretos como uma melhor recuperação dos animais. Uma definição bem aceita atualmente para os probióticos é de que se trata de um aditivo composto de uma cultura pura ou mista de microrganismos vivos que, fornecidos na dieta, beneficiam o hospedeiro pelas propriedades existentes na microbiota natural. As espécies de bactérias que compõem os probióticos geralmente são dos gêneros *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium*, ambos exercendo uma ação estritamente benéfica aos animais (SILVA; ANDREATTI FILHO, 2000). Embora o efeito desejado seja o mesmo, os prebióticos são aditivos diferentes, porque ao invés de fornecerem microrganismos vivos vão oferecer ingredientes alimentares (carboidratos, peptídeos, proteínas e lipídeos) para que o crescimento de certos microrganismos seja favorecido em detrimento de outros. Alternativa que vêm sendo aplicada também na intenção de melhorar a

saúde intestinal é a mistura desses dois aditivos, os chamados simbióticos (MAIORKA et al., 2001).

### 2.2.2 Modulação da capacidade de resposta animal

A modulação da capacidade da resposta animal influencia de forma indireta a infecção pelos coccídios por estimular o sistema imune a atuar de forma mais eficiente ou simplesmente por modificar a fisiologia do animal ao seu favor.

Alguns ácidos graxos de cadeia curta (3-n ou polinsaturados) são compostos cujos efeitos benéficos envolvem o controle do pH intestinal e a recuperação da mucosa (MACARI; MAIORKA, 2000). Os ácidos eicosapentanoico e docosahexanoico, componentes de óleos extraídos respectivamente de peixes e sementes de plantas, são exemplos desses ácidos graxos de cadeia curta. Eles têm sido referenciados como inibidores da proliferação dos coccídios devido à formação de um estado de estresse oxidativo prejudicial ao parasito (ALLEN et al., 1998). Em aves domésticas os resultados práticos revelaram uma redução na severidade da infecção observada através do escore de lesão (ALLEN et al., 1997), da inibição parasitismo intracelular (ALLEN; DANFORT, 1984) e do desenvolvimento das formas endógenas (DANFORT et al., 1997). No entanto a maioria dos resultados foi obtida durante a infecção por *E. tenella*, não ocorrendo resposta significativa na infecção por *E. maxima*. O efeito modulador conferido aos ácidos graxos de cadeia curta se deve principalmente pela capacidade de redução do processo inflamatório que garante uma diminuição do impacto sobre o ganho de peso em frangos de corte (SMITS et al., 1999).

Algumas ervas apresentam propriedades medicinais com efeito positivo na recuperação dos animais desafiados pela coccidiose, como exemplo as plantas *Artemisia annua* e *Curcumina longa*. A primeira, mais conhecida pela sua substância ativa artemisina, vem sendo usada por mais de 2000 anos no tratamento da malária humana (KLAYMAN, 1985). Suas propriedades antiparasitárias têm sido atribuídas ao grupo funcional endoperóxido que induz ao estado de estresse oxidativo. A artemisina purificada utilizada na faixa de 8.5-17ppm por quatro semanas foi capaz de reduzir a eliminação de oocistos durante a infecção por *E. tenella* e por *E. acervulina* (ALLEN et al., 1997). Quanto ao tumeric (C. longa), consiste numa planta cujas propriedades medicinais estão ligadas à substância ativa curcumina (diferulolmetano), um composto fenólico com capacidade antioxidante, antiinflamatória e antitumoral. Quando utilizado a 1% na alimentação de aves domésticas produziu efeito protetor melhorando o ganho de peso, diminuindo o escore de lesão e a produção de oocistos das aves infectadas por *E. maxima*, embora não tenha afetado as aves infectadas com *E. tenella*. Num estudo mais completo realizado na Coreia do Sul, foram testados estratos de quinze diferentes ervas, incluindo-se *Bupleurum chinense*, *Sophora flavencis* e *A. annua*, todas testadas contra *E. tenella*. A taxa de sobrevivência, o escore de lesão, o ganho de peso, diarreia sanguinolenta e a eliminação de oocistos foram investigados na primeira e na segunda semana após a infecção, observando-se uma melhora em diversos parâmetros que apontam para a possibilidade do tratamento com pelo menos cinco desses extratos (YOUN; NOH, 2001).

De uma forma mais distinta, altos níveis de aminoácidos, vitaminas e alguns minerais podem auxiliar na recuperação da infecção. Sabe-se que um aumento na absorção de proteína é comumente demandado durante a fase de recuperação da coccidiose (TURK, 1972; 1974). Sendo assim, aminoácidos são utilizados para um maior desenvolvimento da mucosa intestinal produzindo uma ação trófica sobre as vilosidades, aumentando a capacidade de absorção de nutrientes na luz intestinal e com isso a recuperação das aves (MACARI; MAIORKA, 2000). A glutamina é um aminoácido bastante referenciado como agente trófico, sendo o principal substrato para os enterócitos, tem sido utilizada para melhorar a estrutura da



mucosa intestinal e reduzir os efeitos adversos que levam a atrofia das vilosidades (MAIORKA et al., 2002a). Também foi relatada a suplementação com lisina e metionina em níveis elevados para a queda no ganho de peso de frangos infectados com *E. acervulina* (WILLIS; BAKER, 1981).

As vitaminas A, C, E, K e o Selênio (Se) quando incorporados à dieta, exercem atividades antioxidantes, estabilizadoras de membrana e imunomoduladoras. Colnago et al. (1984) conduziram um experimento com frangos de corte, no qual foram estudados os efeitos da suplementação com Selênio (25ppm) e vitamina E (100 UI/kg) na resposta imune das aves, e ao observarem melhora numa série de parâmetros concluíram que a imunização das galinhas contra a infecção por *E. tenella* poderia ser incrementada pela suplementação com esses nutrientes. Posteriormente, numa série de estudos sobre o efeito dos antioxidantes na coccidiose aviária, Allen et al. (1998) ao examinarem a eficácia do  $\alpha$ -tocoferol a 8ppm na alimentação de aves domésticas infectadas com *E. maxima* e *E. tenella* observaram melhora no ganho de peso, redução no escore de lesão e diminuição na eliminação de oocistos de *E. maxima*, embora o efeito observado para *E. tenella* tenha sido reduzido. Em outro estudo, Allen e Fetterer (2002) ao suplementar com 13-200ppm de  $\alpha$ -tocoferol frangos de corte infectados com *E. maxima* observaram efeitos positivos não só quanto ao escore de lesão como também na eliminação de oocistos. De fato a suplementação dietética com altos níveis de diversos nutrientes tem sido recomendada na manutenção da resposta imune para animais expostos ao estresse e a pressão de infecções associadas às atuais práticas de produção (ALLEN et al., 1998; CREVIEU-GABRIEL; NACIRI, 2001; KLASING et al., 2002).

Outro grupo de aditivos utilizados como moduladores da coccidiose são os osmoprotetores, cujo papel principal é promover uma rápida recuperação da mucosa intestinal. Entre eles destaca-se a betaína, que por ser a substância química utilizada neste estudo será tratado com mais detalhes a seguir.

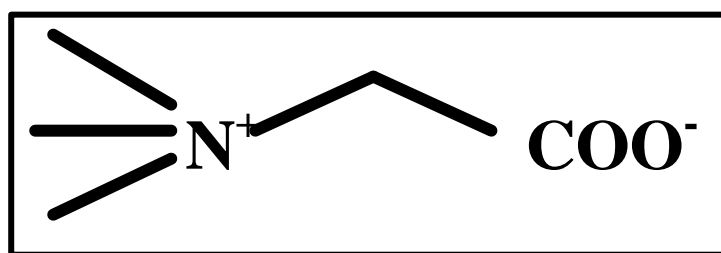
### **2.3 Betaína**

A betaína, ou glicina betaína, é um composto químico naturalmente encontrado numa ampla variedade de microrganismos, plantas e animais. Foi descoberta inicialmente a partir de um extrato do suco de beterraba (*Beta vulgaris*) ainda no século XIX (CRAIG, 2004) e posteriormente encontrada em diversas espécies vivas. A maioria dos organismos utiliza a betaína como fonte de grupamentos metila para uma série de reações metabólicas e também como osmólito na proteção das células contra o estresse osmótico. A função osmoprotetora é particularmente importante para microrganismos e plantas que necessitam sobreviver em condições adversas tais como a falta de água, salinidade alta e até mesmo o congelamento (MUÑOZ-CLARES; VELASCO-GARCIA, 2004). Nestes casos os níveis de betaína e de outros osmoprotetores tipicamente aumentarão na medida em que a exposição a essas condições aumenta, pois as enzimas biossintéticas estresse-dependentes são estimuladas a produção em nível mitocondrial (BOHNERT et al., 1995; BOCH, 1997; CRAIG, 2004). Como resultado tem-se um maior acúmulo de osmoprotetores altamente solúveis em pH fisiológico e não tóxicos no interior das células (MACNEIL et al., 1999). Segundo Yancey (1982) a função da betaína como osmólito vai além da retenção de água e substituição de sais inorgânicos nas células, pois atua também na preservação de enzimas sensíveis a inativação pelas condições adversas. Sendo assim a betaína acumulada é capaz de proteger as células do estresse osmótico permitindo a continuidade das atividades metabólicas normais em condições que normalmente inativariam a célula.

### 2.3.1 Estrutura química e metabolismo

A betaína é um composto aromático classificado como uma metilamônia ou amônia quaternária em virtude de seus três grupamentos metila quimicamente reativos unidos ao átomo de hidrogênio de uma molécula de glicina (KIDD et al., 1997; GOLDFLUS, 1998). Seu peso molecular é de 117,2 sendo representada estruturalmente pela fórmula  $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{-COO}^-$  (Figura 1), podendo ser também chamada de trimetilglicina, glicina betaína ou oxineurina.

Estudos bioquímicos preliminares demonstraram que a betaína é formada a partir da colina. Posteriormente foi estabelecido que a betaína fornece grupamentos metila a homocisteína para a formação de metionina. Também, a betaína pode suprir metionina ao doar grupamentos metílicos para a reciclagem da homocisteína. A metionina, por sua vez, pode ser catabolizada e convertida em cistina. Entretanto, esta conversão não é reversível, pois a cistina não pode ir à metionina. A metionina juntamente com a colina e a betaína corresponde a principal fonte dietética de grupamentos metil para os animais de produção, não sendo estes capazes de sintetizá-los. Têm-se relatado que as respostas no crescimento, obtidas durante a suplementação com a betaína, estão associadas ao processo de utilização desses grupamentos metil e a síntese de diversos compostos a partir de seu catabolismo. Sendo assim a discussão do metabolismo da betaína sem referência a esses outros componentes seria incompleta.



**Figura 1.** Estrutura química de glicina betaína  $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{-COO}^-$ .

Muitos trabalhos descrevem o metabolismo da betaína como parte de uma série de reações bioquímicas (ALMIQUIST; GRAU, 1943; STEKOL et al., 1953; SCHUTTE et al., 1997; KIDD et al., 1997; GOLDFLUS, 1998; MCDEVITTI et al., 2000; NICULESCU; ZEISEL, 2002; NICULESCU et al., 2003; CRAIG, 2004). Embora possa ser fornecida na dieta, a betaína é uma substância normalmente sintetizada no organismo a partir da colina. A colina por sua vez é um composto orgânico classificado no grupo das vitaminas hidrossolúveis (SWENSON; REECE, 1996), sendo encontrada nas células vegetais e animais e na dieta fazendo parte da molécula de lecitina principalmente, podendo também ser encontrada na forma livre ou como parte da esfingomielina. Essas duas moléculas sofrem a ação das enzimas digestivas do trato gastrointestinal para liberar a molécula de colina, a qual é absorvida no jejuno e no íleo por transporte ativo secundário. Apenas 30% da colina são absorvidos de forma intacta, o restante sendo metabolizado por microrganismos intestinais até trimetilamina (RUTZ, 2002). São inúmeras as funções atribuídas à colina no organismo das aves. Ela participa da formação da acetilcolina ao nível de terminações nervosas do parassimpático, previne a perose e faz parte da estrutura dos fosfolipídios fosfatidocolina e esfingomielina, além de atuar como doadora de grupamentos metil. A colina é importante também no metabolismo de lipídios estando relacionada com o acúmulo de triglicérides que leva à síndrome do fígado gorduroso. A conversão da colina em betaína é um processo que ocorre em duas etapas ou dupla oxidação. Na primeira a colina é oxidada em betaína aldeído

por ação da enzima betaína oxidase. Na segunda etapa uma outra enzima, betaína aldeído desidrogenase, cataliza a reação de oxidação irreversível da betaína aldeído em betaína. Na maior parte dos organismos a reação catalizada por esta última enzima é o passo final da rota biossintética da glicina betaína a partir da colina (MUÑOZ-CLARES; VELASCO-GARCIA, 2004).

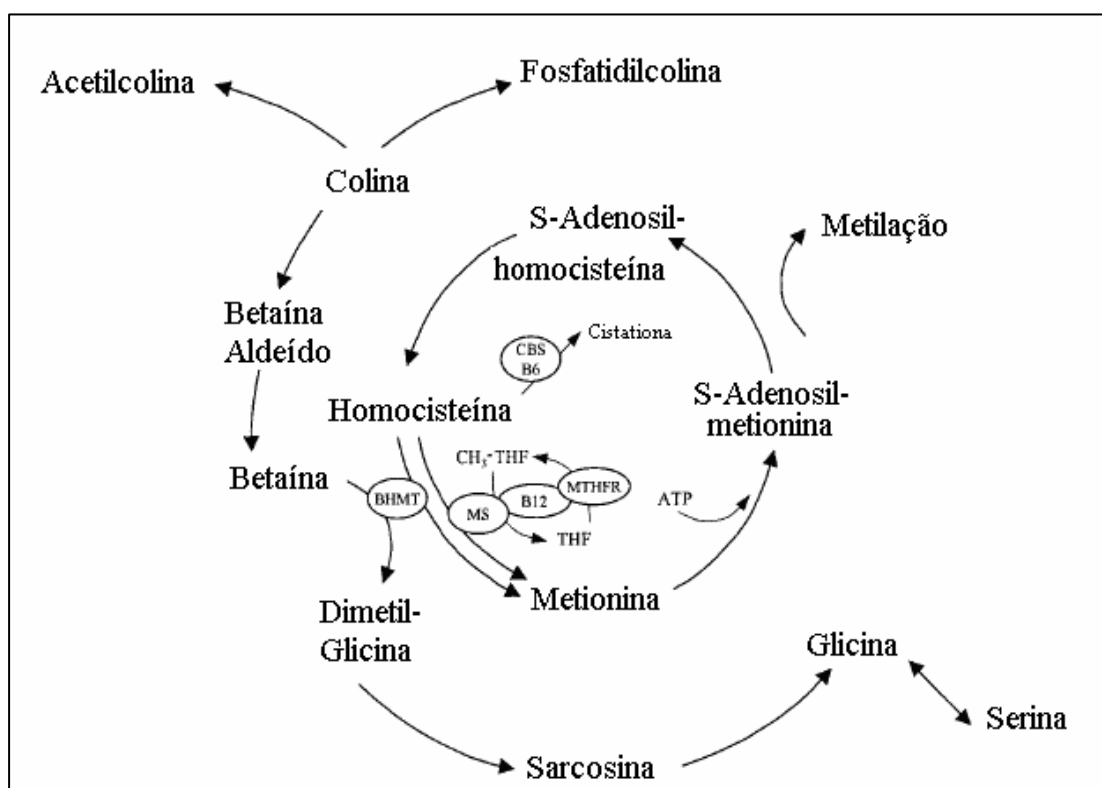
O catabolismo da betaína ocorre através de uma série de reações enzimáticas que ocorrem principalmente na mitocôndria das células renais e hepáticas. No final desta etapa, a conversão da homocisteína em metionina será importante não só para conservar metionina como também desintoxicar a homocisteína e tal processo pode ocorrer tanto via betaína como via 5-metiltetrahidrofolato. A betaína fornece um grupamento metílico a homocisteína por intermédio da enzima betaína-homocisteína metil-transferase com a produção de dimetilglicina, antes trimetilglicina. No processo apenas um grupamento metílico da betaína estará diretamente disponível para a metilação da homocisteína. No entanto, a dimetilglicina, e posteriormente a metilglicina (sarcosina) poderão fornecer seus grupamentos metílicos ao tetrahidrofolato para a formação do 5-metiltetrahidrofolato. Sendo assim, a metionina poderá também ser formada pela transferência de grupamentos metílicos do metiltetrahidrofolato para homocisteína catalizada pela enzima metiltetrahidrofolato-homocisteína transferase e mediada pela coenzima metilcolabamina. A metionina é ainda fonte de enxofre para a síntese da cisteína via reação da serina com a homocisteína para formar cistationina. A cistationina, por ação da cistationina gama-liase sequencialmente formará cisteína livre, sendo esta última uma reação irreversível. A Figura 2 ilustra de forma resumida o metabolismo da betaína descrito.

A betaína exógena, isto é, oriunda exclusivamente da dieta é absorvida no intestino delgado das aves na região do duodeno, podendo ser acumulada em diversos tecidos no intervalo de poucas horas. A absorção da betaína tem sido estudada em diversos organismos, de procariontes a eucariontes, e o mecanismo de acumulação parece ocorrer de forma semelhante. Segundo Craig (2004) o acúmulo ocorre de forma ativa dependente de  $\text{Na}^+$  ou  $\text{Cl}^-$  ou de forma passiva por um sistema independente do  $\text{Na}^+$ . Como aminoácido N-metilado a betaína é transportada por carreadores específicos, principalmente através de betaína  $\gamma$ -aminobutírico ácido e sistema A de transporte de aminoácido. Por ser bastante utilizada no metabolismo a betaína é pouco eliminada via excreção, sendo considerada não tóxica mesmo em níveis elevados.

A metionina por si só é um aminoácido altamente requerido na manutenção do crescimento tecidual nos frango de corte. É hidrolizada superficialmente ou intracelularmente, sendo absorvida no intestino delgado principalmente ao nível jejunal e chegando à corrente via sistema porta. Quantitativamente, a maior parte da metionina, seja sintetizada ou oriunda da dieta, é utilizada em blocos de construção de proteínas (KIDD et al., 1997). A metionina na forma de S-adenosilmetionina é o mais importante doador de grupamentos metílicos no organismo animal, sendo por isso exigida para a biossíntese de muitas substâncias importantes envolvidas no crescimento, como a creatina, carnitina, poliaminas, epinefrina, melatonina, colina e fosfatidilcolina (WHITAKER et al., 2002). Na metilação de ácidos nucléicos (DNA), a qual pode regular a expressão genética específica de certos genes nos tecidos, é especialmente importante em vários processos sendo a reação catalizada por metiltransferases (NICULESCU; ZEISEL, 2002).

Uma dieta deficiente em metionina reduz o ganho de peso, a eficiência alimentar e o teor de proteína na carcaça, além de estimular o consumo de ração, contribuindo com energia adicional e, conseqüentemente, ocasionando acréscimo na deposição de gordura. Para exercer sua função doadora de grupamentos metílicos necessariamente a metionina deverá unir-se a adenosina trifosfato (ATP) passando a S-adenosilmetionina (doadora ativa). Esta finalmente

fornecerá seu grupamento metílico a um aceptor para a síntese de compostos diversos conforme citado anteriormente.



**Figura 2.** Transmetilação da betaína no ciclo da metionina. B6, Vitamina B6; B12, Vitamina B12 (colabamina); BHMT, betaína homocisteína metil transferase; CBS, cistationa  $\beta$ -sintetase; metionina sintetase; MTHFR, metilenotetrahidrofolato redutase; THF, tetraidrofolato; CH<sub>3</sub>-THF, 5-metiltetrahidrofolato. Adaptado de Craig (2004).

### 2.3.2 Fundamentos da aplicação da betaína em dietas animais

A osmorregulação é um processo fisiológico de grande importância para a manutenção da homeostase nos seres vivos. A eficiência desta propriedade está na dependência da habilidade que as células têm de movimentar a água para dentro e fora conforme haja necessidade. A maioria das células procarióticas e eucarióticas se adaptam a condições de estresse osmótico alterando a concentração intracelular por meio de compostos que atuam como elementos efetores do equilíbrio osmótico. Os osmoprotetores são compostos de alta solubilidade, neutros em pH fisiológico e não tóxicos mesmo em altas concentrações. Servem para aumentar a pressão osmótica no interior do citoplasma e ainda são capazes de estabilizar proteínas e membranas quando o nível de sais e a temperatura são desfavoráveis (MACNEIL et al., 1999). Quimicamente são classificados como orgânicos (álcoois polihídricos, aminoácidos e seus derivados e combinações de uréia e metilaminas) e inorgânicos (íons), podendo ser encontrados em organismos de archaeobactérias e vegetais até animais superiores.

As vantagens atribuídas aos sistemas orgânicos sobre os inorgânicos no controle osmótico se referem à compatibilidade com macromoléculas mesmo quando presentes em altas ou variáveis concentrações, sendo capazes ainda de atuarem sem interferir nos processos

enzimáticos e funcionais no interior das células (YANCEY et al., 1982). No estudo de Petronini et al. (1992) foi demonstrado que a adição da betaína ao meio hiperosmótico preveniu até 90% da inibição da proliferação celular, fato ocorrido na sua ausência. É sabido que muitas plantas e bactérias sobrevivem a condições de alta salinidade, dessecação e temperaturas baixas (congelamento) por meio de osmoprotetores (CARPENTER; CROWE, 1988; MACNEIL et al., 1999; BAYLES; WILKINSON, 2000). Animais com alta osmolaridade sanguínea (invertebrados marinhos) usam os compostos orgânicos para regular o fluido intracelular (KIDD, 1997). Da mesma forma alguns peixes podem adaptar-se durante a transferência da água doce para água salgada mantendo o equilíbrio osmótico, processo modulado pela atividade de osmoprotetores orgânicos na extrusão de íons pelas gelras (Na/K-ATPase atividade) e no transporte de água e magnésio via intestino e rins (VIRTANEN et al., 1988).

Muitos relatos indicam que as propriedades osmoprotetoras da betaína foram observadas primeiramente nas bactérias e posteriormente em vários outros organismos (YANCEY et al., 1982; CHAMBERS; KUNIN, 1987; CAYLEY et al., 1992; BOCH et al., 1997). A betaína não utilizada como catabólito para o metabolismo da metionina, via de regra será utilizada como osmoprotetor orgânico. Como exemplo a regulação osmótica através da acumulação de betaína nos rins para proteger as células contra as altas concentrações de eletrólitos e uréia (KETTUNEN et al., 2001a). Também KETTUNEN et al. (2001b) ao estudar o papel da betaína nas células epiteliais do intestino de frangos de corte, observaram que a presença da betaína nas células do duodeno era capaz de protegê-las contra a perda de água frente ao meio hiperosmótico, embora não tenha protegido o tecido do jejuno.

De acordo com Craig (2004), a regulação da atividade osmótica pode trazer muitos outros benefícios. A betaína foi capaz de regular a membrana de eritrócitos contra alterações na conformação; proteger o músculo esquelético contra a degradação da miosina e das enzimas ATPases; proteger a pré-implantação de embriões sobre estresse osmótico *in vitro* e ainda evitar a apoptose prematura de células endoteliais das artérias pulmonares de suínos submetidas ao estresse hipertônico. A modulação da resposta imune também é citada frente ao estresse osmótico nas células de Kupfer no fígado ocasionado por fatores tumorais, fagocitose e supressão da inflamação. Klasing et al. (2002) relataram um aumento do número de linfócitos intra-epiteliais no duodeno de aves infectadas ou não com *E. acervulina* e alimentadas com betaína, além de melhor na atividade fagocitária.

A atuação da betaína como osmoprotetora em tantos processos traz, sobre o ponto de vista da sanidade animal, benefícios claros refletidos na melhor recuperação de enfermidades e também no incremento do desempenho produtivo. Assim como descrito por Goldflus (1997), outro grande benefício é a economia da energia utilizada na osmorregulação das células, pois havendo demanda para o bombeamento de eletrólitos as células estariam consumindo energia metabólica (ATP). O balanço eletrolítico executado pelos rins e pelo trato intestinal das aves deve manter o volume de água ingerido e oriundo dos processos oxidativos equilibrados com a perda evaporativa, a secreção e a excreção de fluidos (BRUNO; MACARI, 2002). Quando afetadas por diarreia o equilíbrio osmótico nas aves é alterado e dentre as causas que podem levar a esta condição estão as infecções bacterianas, virais, fúngicas e parasitárias muitas delas ocorridas simultaneamente. A coccidiose aviária, sendo uma enfermidade entérica está intimamente associada à perdas hidroeletrólíticas causadas não só pela diarreia e a desidratação como também pelo uso dos medicamentos ionóforos que poderão exacerbar a condição de desequilíbrio (VIRTANEN, 1995). Foi demonstrado que nas diarreias a atividade da adenilciclase e do AMPc são estimuladas, o que eleva a atividade secretora das células das criptas e reduzem a absorção de sódio e cloro por parte das vilosidades (FONDACARO, 1986). Como resultado tem-se a formação de uma situação de hiperosmolaridade intestinal e uma estimulação do acúmulo de betaína nas células

epiteliais do intestino, onde exercerá seu efeito osmoprotetor (KIDD et al., 1997). No parasitismo causado por espécies do gênero *Eimeria* nas aves está também associado à diminuição da absorção de nutrientes devido à destruição das vilosidades (MCDOUGALD; REID, 1997). Esta condição tem sido relatada como responsiva a utilização de betaína na dieta (KETTUNEN et al., 2001b). Sendo assim, os resultados práticos do uso da betaína em situações de estresse osmótico estão diretamente relacionados a uma melhora na recuperação das aves, com diminuição da mortalidade, diminuição na perda de peso e melhora no desempenho produtivo. Pesquisas indicam que a quantidade aproximada de betaína para a obtenção de respostas satisfatórias é de 750g/tonelada de ração (GOLDFLUS, 1998).

Embora a função osmoprotetora seja considerada como uma grande vantagem da aplicação da betaína em dietas animais, seu uso como doadora de grupamentos metílicos possui uma posição de destaque, principalmente entre os estudiosos da nutrição animal pelo fato de incrementar positivamente o desempenho produtivo. Como visto anteriormente a betaína exerce um efeito poupador sobre as exigências nutricionais de metionina sendo superior a colina no fornecimento de grupamentos metílicos de um carbono para as reações de transmetilação. Alguns autores afirmam que a betaína é capaz de metilar homocisteína de uma forma três vezes mais eficiente do que a colina, o que explica a ineficiência desta última na substituição da metionina dietética como fornecedora de grupamentos metílicos (STEKOL, 1953). A provável explicação para o fato seria a interferência de vários processos intermediários como a incorporação na lecitina e esfingomielina, necessidade de dupla-oxidação, variação entre as espécies na taxa de conversão e interferência de medicamentos. Outro fator justificável ao uso da betaína na dieta é o balanço entre aminoácidos, recomendado para evitar a perda energética da dieta (ATENCIO et al., 2004). A cistina, assim como a metionina, é considerada como aminoácido fisiologicamente essencial para manutenção, crescimento dos animais e para o desenvolvimento das penas (PINTO et al., 2003). Sendo assim a cistina proveniente da metionina via homocisteína será dependente do seu teor dietético, e no caso de uma dieta pobre, a quantidade de metionina utilizada para sua formação se tornará elevada, comprometendo o processo de remetilação da homocisteína. De acordo com Goldflus (1998), as dietas avícolas inicial, crescimento e terminação devem prover de pelo menos 1200, 1000 e 1000ppm de colina respectivamente para exercerem suas funções. Níveis acima desses podem ser substituídos por betaína, de acordo com o conceito de eficácia total dos produtos comerciais (biodisponibilidade + eficiência química + pureza). Em base química 1,19kg de cloreto de colina (100% pureza; PM=139,63) é equivalente a 1 kg de betaína (100% pureza; PM= 177,5).

Embora teoricamente as aplicações e benefícios da betaína na dieta sejam variados, os resultados das pesquisas têm demonstrado contradições. Ao que tudo indica, os efeitos positivos do seu uso como aditivo alimentar, devido a uma ou outra propriedade, ocorrem quase sempre em situações muito específicas onde os fatores que determinam sua demanda não estão bem esclarecidos. A eficácia da aplicação da betaína tem sido investigada desde os anos 40 (ALMIQUIST; GRAU, 1943) quando estes autores observaram resultados duvidosos quanto ao uso da betaína em trabalhos da época. Posteriormente em seu próprio trabalho utilizaram uma dieta deficiente em aminoácidos sulfurados e colina constatando apenas um efeito parcial da betaína no crescimento das aves. Mais tarde estabeleceram que a inabilidade da betaína em promover o crescimento das aves utilizando-se dietas purificadas era devido aos altos níveis de metionina já existentes (COLNAGO, 1999). Estudos subsequentes continuaram demonstrando grandes incoerências. Stekol et al. (1953) em seu estudo bioquímico das reações de transmetilação entre a colina, betaína, homocisteína e metionina observaram que a betaína era mais eficiente do que a colina no processo de metilação da homocisteína para a formação de metionina *de novo*. Esses resultados contrastaram com os resultados de Lowry et al. (1987). Mais recentemente, baseando-se no fornecimento de

grupamentos metílicos, algumas pesquisas revelaram a capacidade da betaína em ter um efeito poupador sobre a metionina dietética. Virtanen et al. (1996) sugeriram este efeito após utilizarem betaína na dieta de frangos de corte e observarem efeitos positivos, embora efeitos semelhantes não tenham sido observados com tanta clareza em três estudos posteriores (SCHUTTE et al., 1997; MCDEVITTI et al., 2000; ESTEVE-GARCIA; MACK, 2000). No entanto, Virtanen e Rosi (1996) sugeriram que a betaína poderia ser mais eficiente em suprir metionina ao ser utilizada na dieta de frangos de corte sob o desafio da coccidiose. Tal suposição é reforçada pelos trabalhos de Remus et al. (1995) e de Matthews et al. (1997). Esses pesquisadores suplementaram a dieta de aves de corte com betaína a 0,1 e 0,15%, respectivamente, ambos observaram melhoras significativas no desempenho dos animais. Apesar disso, no primeiro caso, quando adicionada a 0,5% a betaína não foi capaz de incrementar o desempenho dos animais. Mais tarde em outro experimento Matthews e Southern (2000), ao utilizar um protocolo semelhante ao citado anteriormente e testando doses e tempos variados de inoculação, observaram discrepâncias consideradas desconhecidas. A eficácia da combinação entre betaína e anticoccidianos ionóforos também tem sido investigada. Numa série de experimentos conduzidos por Augustine et al. (1997), observou-se que os efeitos positivos em relação ao ganho de peso, conversão alimentar e mortalidade durante o uso da betaína (0,15%) associada à salinomicina (66ppm) eram superiores aos efeitos da salinomicina pura, e nenhum efeito positivo foi observado quando utilizada a betaína pura. Também esta combinação foi capaz de afetar o processo de invasão celular em aves infectadas com *E. acervulina* e *E. tenella* (AUGUSTINE; DANFORTH, 1999). Já durante a combinação como a monensina (REMUS et al., 1995) e com narasin (WALDENSTEDT et al., 1999) a betaína não foi capaz de produzir efeitos satisfatórios.

Após revisar a literatura, é possível constatar que até o momento as aves não possuem uma demanda dietética de betaína definida para as condições práticas, principalmente porque muitos fatores estão envolvidos no seu metabolismo e conseqüentemente na sua utilização como doadora de grupos metila. De forma semelhante o mecanismo pelo qual a betaína atua na osmoproteção celular nas aves é pouco conhecido. No entanto, a suplementação com a betaína poderá ser vantajosa em certas condições fisiológicas incluindo-se uma alta demanda metabólica para o crescimento e para o equilíbrio osmótico. Sendo assim, os resultados positivos dessa aplicação estarão na dependência da formulação da dieta e suprimento de aminoácidos e vitaminas, da relação de custo e benefício e principalmente do estado sanitário do plantel. Adicionalmente, existem relativamente muitos estudos abordando os efeitos do uso da betaína com foco no hospedeiro, mas diferentemente pouco se conhece a respeito da atuação da betaína no metabolismo do parasito.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado como parte do projeto de título “Suplementação de Betaína e o Desempenho e Características da Carcaça, Digestibilidade da Ração e o Desenvolvimento do Intestino Delgado de Frangos de Corte Infectados por *Eimeria acervulina*”, desenvolvido na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro com participação de Tânia Márcia Soares Niang, aluna do curso de Pós-graduação em Zootecnia; Augusto Vidal da Costa Gomes, professor do Departamento de Nutrição Animal e Pastagens (DNAP) do Instituto de Zootecnia; Marcel Teixeira, aluno do curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias e Carlos Wilson Gomes Lopes, professor do Departamento de Parasitologia Animal (DPA) do Instituto de Veterinária, estes dois últimos responsáveis por parte do projeto proposta como “Alterações Clínicas, Patológicas e Biológicas Durante a Suplementação com Betaína em Frangos de Corte Infectados Experimentalmente com *Eimeria acervulina*”.

#### 3.1 Animais e Instalações

Foram utilizados no estudo 390 pintos de corte machos da linhagem comercial Cobb, oriundas de um incubatório localizado no estado de São Paulo. No primeiro dia de vida estes foram transportados utilizando-se caixas plásticas previamente higienizadas com água fervente e levadas diretamente para o DNAP, onde foram mantidas durante todo o experimento. Embora a maior parte das análises tivesse sido realizada no período da infecção propriamente dita (14 – 28 dias de vida) o restante das aves foi mantido até a idade adulta aos 42-43 dias de vida e depois encaminhadas para o abate.

O alojamento foi montado numa sala experimental dotada de ventilação, iluminação, água tratada e toda estrutura necessária à higiene das instalações. As aves foram alojadas em dez baterias de metal de três andares cada qual medindo 96 x 80 x 39 cm e equipadas com bandejas coletoras, comedouros tipo prato e bebedouros de pressão. Cada andar foi equipado com uma lâmpada incandescente de 150w para fornecer calor nos primeiros dias de vida, sendo substituída por outra de 60w na metade da segunda semana. Os equipamentos de primeira idade utilizados foram sendo retirados ou substituídos de acordo com o desenvolvimento do plantel.

Os pintinhos foram adquiridos já vacinados contra doença de Marek sendo vacinados aos sete dias de vida por via ocular com a vacina New Vaccin La sota (BIO VET S.A) contra Doença de Newcastle. Exceto por isto cuidados sanitários foram aplicados somente para evitar a contaminação ambiental através da restrição do acesso, fluxo de manejo nas gaiolas, uso de roupas apropriadas e uso de pedilúvio na entrada da sala.

Quanto às análises laboratoriais, foram todas conduzidas nas instalações do Laboratório de Coccídios e Coccidioses, Projeto Sanidade Animal (Embrapa/UFRRJ), DPA, IV desta IFES.

#### 3.2 Alimentação e Grupos Experimentais

A dieta basal era composta de uma mistura de milho, farelo de soja e premix mineral comercial, fornecida em programa de alimentação com duas fases sendo a inicial do primeiro aos 21 dias de idade e a final dos 22 aos 43 dias de idade. Quanto à formulação do alimento (tabela 1), esta foi realizada de acordo as exigências nutricionais das aves de corte (ROSTAGNO et al., 2000). Água e comida foram fornecidas *ad libitum* durante todo o experimento.



A suplementação de betaína (Betafin<sup>®</sup> 96% de pureza - DANISCO) foi feita nas duas fases em substituição ao ingrediente inerte (caulim) na ração. As dietas contendo diferentes níveis de betaína foram comparadas com um tratamento controle, sem a incorporação de qualquer aditivo (0% de betaína) e com outro tratamento contendo medicação anticoccidiana (salinomicina 20.000mg/kg), promotor de produção antimicrobiano (penicilina G potássica 2.000mg/kg) e 0% de betaína. Sendo assim os grupos experimentais ficaram distribuídos da seguinte forma:

- **T1:** Frangos de corte alimentados com dieta basal, Salinomicina e penicilina G potássica; infectados com  $2 \times 10^5$  oocistos de *E. acervulina*.
- **T2(Controle positivo):** Frangos de corte alimentados exclusivamente com dieta basal e infectados com  $2 \times 10^5$  oocistos de *E. acervulina*.
- **T3:** Frangos de corte alimentados com dieta basal + betaína 0,05%; infectados com  $2 \times 10^5$  oocistos de *E. acervulina*.
- **T4:** Frangos de corte alimentados com dieta basal + betaína 0,10%; infectados com  $2 \times 10^5$  oocistos de *E. acervulina*.
- **T5:** Frangos de corte alimentados com dieta basal + betaína 0,15%; infectados com  $2 \times 10^5$  oocistos de *E. acervulina*.

**Quadro 1.** Composição da dieta basal de frangos de corte (ROSTAGNO, 2000).

INGREDIENTES	% da composição	
	1 a 21 dias	22 a 42 dias
Milho (7,8% PB)	55,040	58,422
Farelo de soja (44,8% PB)	37,666	33,908
Óleo de soja	3,132	3,971
Fosfato bicálcico	1,808	1,594
Calcário calcítico	0,976	0,919
Sal	0,453	0,381
Suplemento mineral-vitamínico <sup>1</sup>	0,386	0,320
DL-metionina	0,217	0,180
Lisina líquida (64%)	0,122	0,105
Inerte (caulim)	0,200	0,200
Total	100,00	100,00
<b>Energia e nutrientes</b>	<b>Composição nutricional calculada</b>	
EM Kcal/kg	3,000	3,100
Proteína bruta %	21,400	19,947
Fibra bruta	3,303	3,147
Linoleico %	2,979	3,460
Lisina %	1,263	1,156
Metionina + cistina %	0,897	0,825
Treonina %	0,852	0,796
Metionina %	0,553	0,498
Triptofano %	0,278	0,255
Cálcio %	0,960	0,874
Fósforo disponível %	0,450	0,406
Sódio %	0,222	0,192

<sup>1</sup>Supriu por Kg da dieta: Vit. A 1.600.000 UI, Vit. D<sub>3</sub> 500.000 UI, Vit. E 3.200mg, Vit. K<sub>3</sub>, 400mg, Vit. B<sub>1</sub> 300mg, Vit. B<sub>2</sub> 800mg, Vit. B<sub>6</sub> 400mg, Vita B<sub>12</sub>, 3000mcg, ácido pantotênico 2.200mg, ácido nicotínico 6.000mg, colina 90.0000mg, biotina 10mg, ácido fólico 100mg, Fé 12.000mg, Mn 14.000mg, Cu 1.600mg, Zn 10.000mg, Se 60mg e 6000mg de antioxidante.

Os grupos experimentais foram organizados num delineamento por blocos ao acaso (SAMPAIO, 2002) constituído de seis repetições de treze aves em cada um dos cinco tratamentos. Cada andar das baterias representou um bloco e cada gaiola uma repetição sendo os tratamentos alinhados verticalmente de forma a evitar a contaminação oriunda da queda de alimento das gaiolas superiores para as inferiores. Tanto a distribuição dos tratamentos como das repetições foram realizadas inteiramente ao acaso com sorteio.

### 3.3 Preparo do Material Infectante e Inoculação

O material infectante era composto de oocistos de *E. acervulina* cepa Ea3LPL8a da Embrapa Suínos e Aves, unidade descentralizada da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, cedido pelo pesquisador Dr. Carlos Alberto Fagonde Costa. O inóculo foi preparado com o objetivo de se obter a dose infectante aproximada de  $2 \times 10^5$  (duzentos mil) oocistos esporulados por cada 1ml de suspensão. Esta dose foi determinada considerando-se os seguintes fatores:

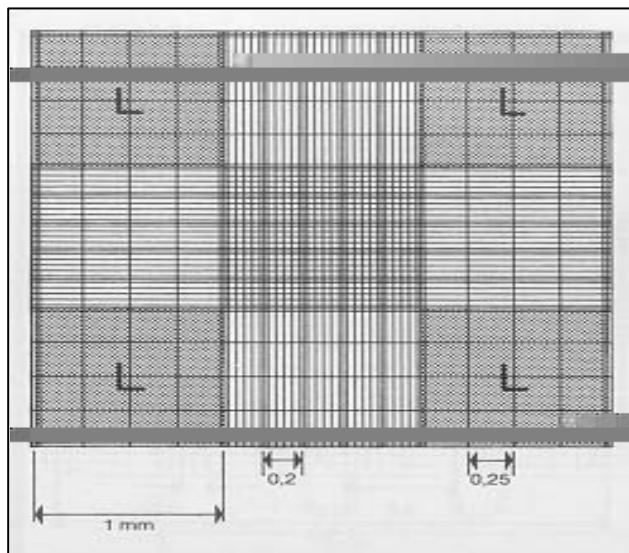
- A. A espécie do gênero *Eimeria* em questão, considerada pouco patogênica e causadora de infecção subclínica;
- B. A cepa envolvida, considerada de média patogenicidade;
- C. A dose infectante média necessária para produzir infecção moderada em experimentação (ECKERT et al, 1995);
- D. Volume ideal para inoculação individual nas aves.

Uma vez determinada a dose individual, procedeu-se com o preparo do material infectante. A lavagem foi realizada até a remoção total da solução de dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ), devido sua alta toxicidade para as aves. A quantificação foi feita com auxílio de uma câmara de Neubauer (ECKERT et al., 1995). Tal procedimento foi realizado momentos antes da inoculação, evitando-se assim a contaminação microbiológica e o comprometimento da integridade dos oocistos.

*Material e equipamentos:* tubos cônicos de centrífuga com capacidade para 10ml, solução salina 0,9% NaCl, pipetas plásticas, centrifugador Excelsa 3 da marca Fanen<sup>®</sup>, modelo 204N; microscópio binocular Carl Zeiss; contador de células manual da marca Clay Adams<sup>®</sup>, câmara de Neubauer, lamínulas de vidro 18 x 18mm.

*Procedimento:* o material foi distribuído nos tubos e centrifugado a 3000rpm (500 g) por 10 minutos, e a seguir o sedimento foi suspenso em solução salina. Tal operação foi repetida por três vezes até que os oocistos estivessem totalmente livres da solução de dicromato de potássio. O sedimento final contendo os oocistos foi suspenso em solução salina e armazenado sob refrigeração a 4-8 °C. A seguir procedeu-se a quantificação dos oocistos com auxílio de uma câmara de Neubauer, adaptável ao microscópio óptico cuja depressão central é marcada com um quadrículo. Esta área marcada L (Figura 3) corresponde a  $1\text{mm}^2$ . A depressão central por sua vez está localizada a 0,1 mm da superfície de contato com a lamínula, de forma que quando preenchida o volume de líquido compreendido neste espaço é de  $0,1\text{ mm}^3$  ou  $0,1\mu\text{l}$  (REINA, 2005). Esta região correspondeu à área de contagem de oocistos, semelhante ao empregado normalmente para contagem de leucócitos, do valor total quantificado nas quatro áreas obteve-se uma média aritmética. Considerando-se que os valores representam o número de oocistos em  $0,1\mu\text{l}$ , para se obter valores expressos em número de oocistos por mililitro os valores obtidos foram multiplicados por  $10^4$  (dez mil). Por meio de regra de três foi calculada a quantidade total de diluente (solução salina) necessária

para se obter um total de trezentas doses do inóculo, suficientes para a inoculação das aves do experimento.



**Figura 3.** Câmara de Neubauer. L. Região utilizada para contagem de oocistos. Adaptado de REINA (2005).

*Inoculação:* As aves foram inoculadas individualmente aos 14 dias de vida ou 0 DAI. (dias após a infecção) por via oral com 1ml do inóculo preparado. Para tal foram utilizadas pipetas do tipo Eppendorf® de 1,25ml introduzidas ao máximo possível via oral objetivando-se atingir o inglúvio (Figura 4).



**Figura 4.** Inoculação das aves no 14º dia de vida.

### 3.4 Avaliação de Parâmetros Clínicos

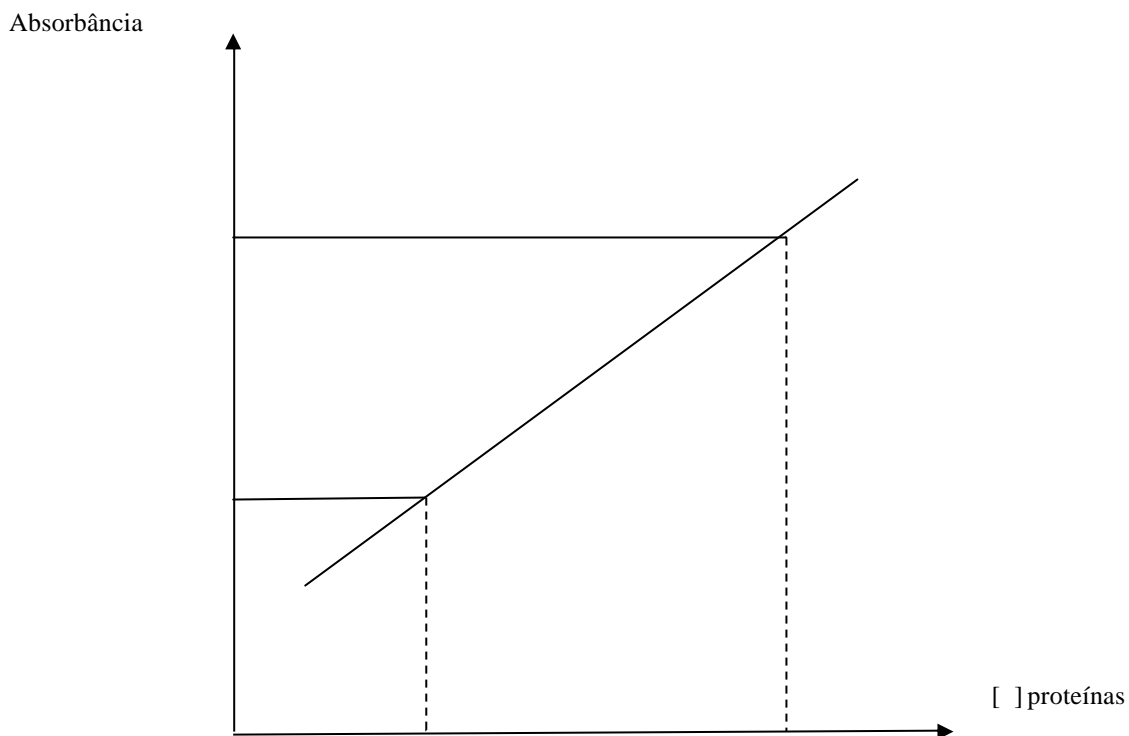
Embora exista uma idéia geral de que a coccidiose causada por *E. acervulina* a campo seja caracterizada como subclínica, alguns sinais podem ser observados e uma vez associados a parâmetros de desempenho, podem caracterizar uma resposta clínica à infecção. Sendo assim, diariamente no período da manhã as aves foram inspecionadas diretamente nas gaiolas. Os principais sinais avaliados foram diarreia ou o simples amolecimento das fezes, anorexia e mortalidade. Os demais parâmetros avaliados como resposta clínica foram o ganho de peso, o consumo de alimento, o nível de proteínas plasmáticas totais e a produção de oocistos, determinados conforme descrito a seguir.

*Mortalidade:* Foi registrada diariamente através da observação direta nas gaiolas.

*Ganho de Peso:* O ganho de peso é considerado um dos principais parâmetros para a análise do impacto da coccidiose (LONG et al., 1976). Foi determinado a partir da média de cada tratamento no 0, 7° e 14° DAI. A pesagem das aves foi realizada individualmente, como amostras representativas (2 aves) selecionadas aleatoriamente de cada repetição.

*Consumo de ração:* O alimento fornecido e as sobras eram pesados semanalmente, assim o cálculo do consumo de ração foi obtido com base no consumo médio por unidade experimental, dentro dos períodos de 0-7 e 7-14 DAI.

*Dosagem de Proteínas Plasmáticas Totais (LOWRY et al., 1951):* As amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca durante cada necropsia, colocadas em tubos de vidro com capacidade para 5ml contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 15%. A seguir procedeu-se com a centrifugação a 3000rpm (500 g) por 10 minutos para separação do plasma, armazenando-se em tubos tipo Eppendorff® com capacidade para 2ml sob refrigeração (-18°C) até análise. *Material e equipamentos:* Solução A (0,5ml de tartarato de Na e K 2%, 0,5ml de sulfato de cobre 1% e 50ml de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 2%; Solução B (Folin ciocatus phenomogenio e H<sub>2</sub>O destilada 1:3); Padrão Soro Albumina Bovina SIGMA® 1mg/ml; tubos de vidro com capacidade para 5ml, pipetas calibradas, ponteiras plásticas, papel laminado, placas de poliestireno, espectrofotômetro da marca Bio-Rad® (Japão) modelo 550. *Procedimento:* Inicialmente calibrou-se o filtro do espectrofotômetro para 655nm. A seguir foram preparadas cinco diluições do padrão adicionando-se 5, 10, 20, 30, 40 e 50ml do padrão e H<sub>2</sub>O destilada para completar o volume de 200ml. Depois disso as amostras foram distribuídas nos tubos em três diluições (5, 10 e 20ml de padrão e H<sub>2</sub>O destilada até o volume de 200ml); Colocou-se 1ml da solução A, cobriu-se com papel laminado e aguardou-se por 10min para se completar a reação; Colocou-se 100µl da solução B, homogeneizou-se. Depois de aguardados 30 minutos 100µl do material eram transferidos para uma placa de poliestireno para a leitura. A partir dos dados obtidos no espectrofotômetro, do grupo da diluição padrão, procedeu-se com a construção da curva padrão a partir de um gráfico cujo eixo das abscissas representava a concentração de proteína enquanto o eixo das ordenadas representa as absorbâncias (Figura 5). Desta forma a concentração de proteínas de cada amostra pode ser determinada a partir de uma média ponderada das absorbâncias das três diluições amostrais.



**Figura 5.** Curva padrão para a determinação da concentração das proteínas plasmáticas totais.

*Análise Laboratorial e Determinação do OoPG:* Todo o método de análise foi feito conforme Duszynski e Wilber (1997), exceto pela contagem de oocistos por grama de fezes realizada de acordo Menezes e Lopes (1995). *Materiais e equipamentos:* frascos plásticos com capacidade para 35ml; espátula de metal; balança de precisão da marca Precision<sup>®</sup> modelo PR5000 (precisão de 1dg); centrifugador Excelsa 3 da marca Fanen<sup>®</sup>, modelo 204N; microscópio binocular Carl Zeiss; contador de células manual da marca Clay Adams<sup>®</sup>; tubos plásticos cônicos para centrifugação com capacidade para 10ml; solução saturada de açúcar (1,28g/ml: 500g de açúcar do tipo cristal adicionado de 350ml de água destilada e 5ml de fenol); lâminas de vidro; lamínulas de vidro 18 x 18mm; pipetas plásticas de 3ml; peneiras (tamis) com malha de 250 $\mu$ ; gaze de algodão. *Amostras:* As fezes foram coletadas diariamente no período da manhã diretamente das bandejas coletoras das gaiolas, iniciando no primeiro dia de vida dos pintinhos e estendendo-se até o 22<sup>o</sup> DAI, momento em que a eliminação de oocistos se aproximou de zero. No laboratório cada amostra coletada era separada em duas partes. A primeira equivalente a 1 a 3g de fezes era separada destinando-se o diagnóstico e a contagem de oocistos. A segunda parte com todo o material restante era colocada diretamente em solução de dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) a 2,5% na proporção de 1:5 (fezes/solução), destinada à esporulação na temperatura do laboratório (23-25°C) e posterior armazenamento para estudo morfológico. Para o armazenamento eram utilizados frascos de vidro preenchidos até a metade de sua capacidade (150ml) permitindo a presença do ar, tampados e mantidos sob refrigeração entre 3 e 5°C. *Processamento:* retirou-se 1 a 3g de fezes de cada amostra e diluiu-se em 100ml de água destilada. O conteúdo foi homogeneizado e filtrado através da peneira forrada duplamente com a gaze de algodão. Do filtrado uma alíquota de 1ml foi retirada e centrifugada a 3000rpm (500 g) por 5 minutos. O sedimento resultante foi suspenso em solução saturada de açúcar (28g/l) e centrifugado a 1500rpm (250 g) por 5 minutos. Após

a centrifugação uma lamínula era colocada na borda do tudo sobre o menisco convergente, e após 15 minutos retirada para observação em microscópio.

*Contagem de oocistos:* após o processamento as lâminas contendo os oocistos foram examinadas de lado a lado em objetivas de 40x, contando-se todos os oocistos observados. O total de oocistos era convertido para o volume total multiplicando-se por 10. Este valor por sua vez era ainda multiplicado pelo fator de correção 10 para a obtenção do valor real de oocistos por grama de fezes (OoPG). Esse procedimento foi ajustado conforme a ocasião, pois nos momentos de grande eliminação, devido a grande quantidade de oocistos, a diluição do material precisava ser aumentada. Do contrário ocorreu quando as contagens se tornaram muito baixas, necessitando-se de uma quantidade de material fecal maior para uma contagem mais apurada.

*Determinação da produção total de oocistos:* Dada pelo somatório de todas as contagens de oocistos realizadas em cada tratamento. A seguir a dinâmica dessa produção foi avaliada com o auxílio de um gráfico.

### **3.5 Patologia**

A avaliação patológica compreendeu de observação das lesões macroscópicas através do escore de lesão, e lesões microscópicas pela análise histopatológica e morfologia das vilosidades.

*Necropsia:* As necropsias foram feitas em datas pré-determinadas, considerando-se os períodos pré-patente e patente de *E. acervulina* e as atividades a serem realizadas durante o experimento. Sendo assim, as aves foram necropsiadas nos dias 0, 4, 7 e 14 após a infecção (DAI). Para tal seis aves eram retiradas de cada tratamento, sendo uma de cada repetição, totalizando-se 30 aves retiradas a cada necropsia. As aves retiradas das baterias eram identificadas e transportadas em gaiolas até o laboratório para análise. Quanto à eutanásia das aves foi realizada por deslocamento cervical, de acordo com os procedimentos e métodos previstos na Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002, conforme apresentado pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária – CFMV, art. 16, alínea "f" da Lei nº 5.517/68, de 23 de outubro de 1968 (CRMV-RJ, 2005). Durante a necropsia fragmentos de aproximadamente 2cm eram retirados da região do duodeno (alça duodenal) de cada ave e fixados com solução de formalina 10 % tamponada (pH 7,0) para o processamento histológico.

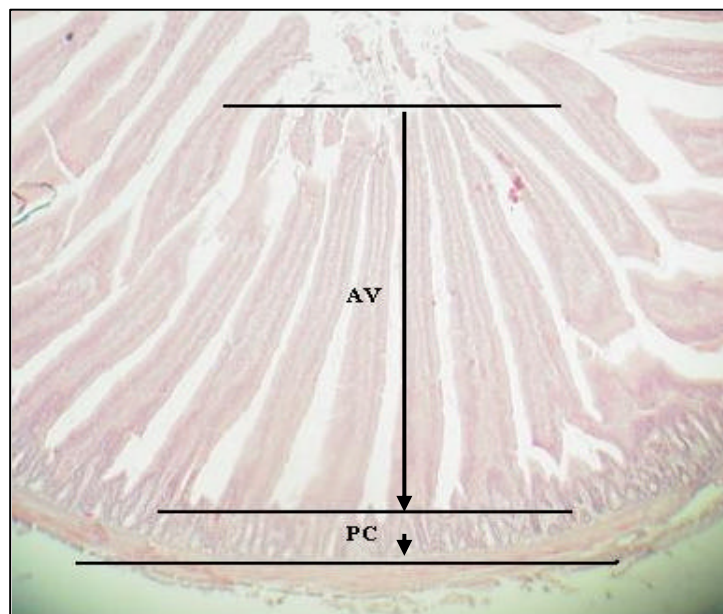
*Escore de lesões:* O escore foi realizado segundo o método descrito por Johnson e Reid (1970) conforme descrito:

- 0: Sem lesões macroscópicas.
- +1: Lesões dispersas esbranquiçadas contendo oocistos confinadas ao duodeno. Estas lesões se posicionam transversalmente ao eixo do comprimento, orientadas na parede intestinal como os degraus de uma escada (estrias transversais). Devem ter uma variação média de no máximo 5 lesões/cm<sup>2</sup>.
- +2: As lesões são mais próximas entre si, mas não coalescentes. Podem se estender até aproximadamente 20 cm além do duodeno em aves de até três semanas de idade. A parede intestinal não demonstra espessamento e o conteúdo do trato digestivo está normal.

- +3: As lesões são pequenas, porém mais numerosas se tornando coalescentes deixando o intestino bastante coberto. A parede intestinal está espessada e o conteúdo aquoso. As lesões devem se estender até aproximadamente o divertículo de Meckel.
- +4: A mucosa apresenta-se acinzentada com colônias completamente coalescentes. Podem ocorrer petéquias ou, em infecções extremamente severas, a mucosa inteira fica congesta. Lesões individualizadas são praticamente indistinguíveis na região anterior do intestino. Lesões típicas com estrias transversais aparecem na porção média do intestino. A parede intestinal está muito mais espessa e o intestino está cheio de um exsudato cremoso que deve conter um grande número de oocistos. As aves geralmente morrem de coccidiose quando o escore é +4.

*Histopatologia:* Os tecidos obtidos durante as necropsias foram processados pela técnica de inclusão em parafina ou Histosec<sup>®</sup> (Merck), cortados com aproximadamente 5µm e corados pela HE (Hematoxilina e Eosina) e PAS (Periodic Acid Schiff), conforme Behmer et al. (1976). A análise histopatológica teve por objetivo avaliar as formas endógenas do parasito durante o desenvolvimento das aves. Além disso, a ocorrência de lesões características da infecção por *E. acervulina* foi avaliada considerando-se os diferentes grupos experimentais.

*Morfologia das Vilosidades Intestinais:* Este procedimento foi aplicado com a finalidade de avaliar o grau dos danos causados a estrutura da mucosa intestinal nos diferentes grupos experimentais. Foram mensuradas a altura das vilosidades, profundidade das criptas e a razão (V/C) entre esses dois valores (Figura 6). Para tal utilizou-se um microscópio binocular Carl Zeiss em objetiva de 40x, acoplado de ocular micrométrica K-15x-PZO (Polônia) para mensuração. Foram feitas 30 medidas por tratamento, obtidas a partir da média de cinco medidas por repetição, correspondentes as quatro datas coletadas entre 0 e 14° DAI. Os valores foram expressos em micrômetros.



**Figura 6.** Corte histológico do duodeno de frangos de corte. Altura de vilosidade (AV) e profundidade de cripta (PC). HE, 40X.

### **3.6 Material Fotográfico**

As fotografias dos oocistos e das formas teciduais foram feitas com auxílio de um microscópio triocular JENAPOL/Carl Zeiss Jena (antiga RDA) acoplado com câmera fotográfica modelo fKAS Automatic-2 e filmes Kodacolor ISO 100 (21 DIN) (Kodak, México) ou câmera digital Sony® Mavica modelo MVC-CD250.

### **3.7 Análise Estatística**

As análises estatísticas foram realizadas de acordo com um delineamento experimental em blocos ao acaso esquematizado conforme Sampaio (2002). Os cálculos de média e desvio padrão foram realizados com auxílio do programa Microsoft Excel®, a análise de variância bem como os testes de comparação de médias foram realizadas com auxílio do programa SISVAR versão 4.6 (FERREIRA, 2000).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Parâmetros Clínicos

Antes da infecção dos animais, com exceção das mortes ocorridas durante o transporte, apenas duas aves (0,5%) vieram a óbito. Embora o período pós-vacinal fosse caracterizado por apatia e penas arrepiadas de algumas aves, não ocorreram quaisquer outros sinais de doenças durante a adaptação dos pintinhos. Após a infecção, sinais clínicos de coccidiose começaram a ser observados no plantel, porém de forma branda e homogênea. No 3º DAI observou-se o conteúdo esbranquiçado das fezes aumentado em aproximadamente 50% em todo plantel e variando em intensidade de gaiola para gaiola nos grupos experimentais, quase sempre associados com um pouco de apatia das aves. No dia seguinte (4º DAI), em todos os grupos observou-se amolecimento do conteúdo fecal que progrediu para diarreia no 5º DAI, ainda assim, variando de gaiola para gaiola e dentro do mesmo grupo experimental. No 6º DAI foi observado conteúdo mucóide oriundo de uma intensa secreção. Em algumas aves tal observação ocorreu durante um período de aproximadamente 36h, sendo que nas aves do grupo controle (T2) estes sinais foram mais evidentes. Entre os grupos que receberam algum tipo de tratamento o estado clínico geral durante o restante do experimento foi bom e o apetite normal bem como a ingestão de água. Também não foi observado óbito neste período. A partir do 7º DAI todo o plantel apresentou sinais de recuperação evidentes permanecendo assim até o final do experimento. O taxa de mortalidade total durante o período agudo (0-14 DAI) foi de 0,5%. Embora alguns sinais pudessem ser observados, a sintomatologia foi pobre ocorrendo de forma semelhante em todos os grupos experimentais.

#### 4.1.1 Consumo de ração e Ganho de Peso

Os valores do consumo de ração e do ganho de peso estão relacionados respectivamente na Tabela 1. Cabe lembrar que aqui estes dados não foram utilizados na intenção de se avaliar o desempenho nutricional propriamente dito das aves, pois esta tarefa fora executada previamente por Niang (2005). Sendo assim, os dados servirão para dar suporte à avaliação do impacto clínico da coccidiose durante o experimento, conforme descrito por Long et al. (1976) e Chapman (1998).

De acordo com os resultados obtidos pelo teste SNK observa-se que nos períodos entre o 1º e o 7º bem como de 7º a 14º DAI, não foi observada nenhuma diferença significativa ( $p>0,05$ ) no ganho de peso dos animais dentre os diversos tratamentos.

Quanto ao consumo de ração, este foi afetado significativamente ( $p<0,05$ ) de 1-7 DAI sendo que o grupo que recebeu betaína a 0,1% na ração (T4) teve consumo menor em relação aos grupos T1, que recebeu ração com salinomicina e promotor de produção, T2 (controle positivo) e T3, aves suplementadas com betaína 0,05%. Este fato pode ser considerado inesperado, pois uma queda no consumo indicaria a inapetência das aves em função da infecção, porém o consumo de ração foi maior no grupo controle positivo do que no grupo tratado com betaína 0,1%. De 7-14 DAI o grupo T4 (betaína 0,1%) teve um consumo de ração menor que os demais, porém significativamente inferior somente em relação ao grupo T1 suplementado com a medicação anticoccidiana.

**Tabela 1.** Consumo de ração e ganho de peso de frangos de corte de 1-7 e 7-14 dias após a infecção com *Eimeria acervulina*.

		Avaliação (Kg)			
		Consumo de ração		Ganho de Peso	
DAI		1° - 7°	7° - 14°	1° - 7°	7° - 14°
Tratamentos	T1	0,744 <sub>b</sub>	0,930 <sub>b</sub>	0,403 <sub>a</sub>	0,665 <sub>a</sub>
	T2	0,742 <sub>b</sub>	0,877 <sub>ab</sub>	0,393 <sub>a</sub>	0,587 <sub>a</sub>
	T3	0,742 <sub>b</sub>	0,890 <sub>ab</sub>	0,375 <sub>a</sub>	0,634 <sub>a</sub>
	T4	0,712 <sub>a</sub>	0,853 <sub>a</sub>	0,383 <sub>a</sub>	0,656 <sub>a</sub>
	T5	0,722 <sub>ab</sub>	0,893 <sub>ab</sub>	0,384 <sub>a</sub>	0,636 <sub>a</sub>

<sup>ab</sup>Valores de média na mesma coluna sem subscrito comum diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste SNK. DAI=dias após a infecção.

Hipoteticamente esta diferença poderia ser causada pela quantidade de oocistos inoculados e por isso uma maior severidade da infecção. Porém, num estudo posterior Matthews e Southern (2000) observaram efeitos contraditórios entre dois experimentos elaborados com o mesmo protocolo, pois embora a betaína tivesse afetado positivamente o ganho de peso das aves durante a infecção crônica com  $2,5 \times 10^5$  oocistos esporulados de *E. acervulina*, observaram o efeito oposto nas aves não infectadas ou naquelas infectadas com  $5 \times 10^6$  oocistos esporulados. Esteve-Garcia e Mack (2000) também não conseguiram observar uma resposta clínica significativa quanto ao ganho de peso com o uso da betaína em frangos de corte não infectados, e Almquist e Grau (1943) já haviam relatado que tal efeito positivo no ganho de peso dependia de certas condições tais como uma deficiência de colina. Klasing et al. (2002) ao infectar aves com  $4,6 \times 10^4$  oocistos de *E. acervulina* observaram incapacidade da betaína nos níveis 0,0; 0,5 e 0,10% em afetar tanto o consumo de ração como o ganho de peso dos animais. Diferentemente, Waldenstedt et al. (1999) observaram efeitos positivos no peso vivo das aves alimentadas com betaína 0,1% utilizando uma cultura mista com várias espécies do gênero *Eimeria* e mais recentemente, embora Fetterer et al. (2003) tenham observado um ganho de peso significativamente melhor nas aves alimentadas com betaína 0,15% na ração e infectadas com *E. maxima*, o mesmo não foi observado com a infecção por *E. acervulina* ou *E. tenella*. Estes fatos demonstram que as variações na metodologia aplicada podem explicar em parte a ocorrência de discrepâncias entre os resultados, mas não é provavelmente o único motivo, podendo haver mais fatores até então desconhecidos, afetando a resposta clínica durante o uso da betaína como aditivo frente ou não ao desafio infeccioso com espécies do gênero *Eimeria*.

#### 4.1.2 Proteínas Plasmáticas Totais

Embora os níveis de proteínas totais tivessem algumas variações entre os grupos experimentais nos dias avaliados, pouca diferença foi observada entre os tratamentos (Tabela 2). No 4° DAI, devido a perda de muitas parcelas, o tratamento 1 não fora incluído na comparação estatística de médias. Quando comparados os demais grupos, embora T3 tivesse menor nível de proteínas plasmáticas e T4 o maior, estes valores não foram diferentes significativamente ( $p > 0,05$ ). No 7° DAI o grupo tratado com betaína 0,15% (T5) teve os

menores níveis de proteínas sendo, porém diferente estatisticamente somente em relação ao T1 com o maior nível de proteínas plasmáticas.

No 14º DAI, embora o grupo T2 (controle positivo) tenha apresentado o menor nível de proteínas e T5 o maior também não houve significância estatística. Assim como observado durante a avaliação do ganho de peso o fato de um grupo tratado com betaína ter níveis menores de proteínas plasmáticas foi inesperado, não sendo possível uma explicação. Mathews e Southern (2000) também observaram níveis menores de proteínas plasmáticas nas aves suplementadas com betaína, porém o fato ocorreu com aves não desafiadas por *Eimeria* enquanto nas aves infectadas com  $2,5 \times 10^5$  oocistos de *E. acervulina*, a suplementação com betaína a 0,1% melhorou os níveis de proteínas plasmáticas em dois experimentos distintos. Anteriormente a estes autores, nenhuma pesquisa faz referência ao efeito do uso da betaína no nível de proteínas plasmáticas durante a coccidiose, não sendo possível estabelecer mais comparações com os resultados aqui encontrados.

**Tabela 2.** Níveis de proteínas plasmáticas em frangos de corte infectados experimentalmente com *Eimeria acervulina*.

DAI <sup>1</sup>	N <sup>2</sup>	Tratamentos <sup>3</sup>	Média (µg/µl)
4	6	T1	-
	6	T3	39,42 <sub>a</sub>
	6	T5	40,45 <sub>a</sub>
	6	T2	42,10 <sub>a</sub>
	6	T4	44,97 <sub>a</sub>
7	6	T5	31,20 <sub>a</sub>
	6	T3	36,07 <sub>ab</sub>
	6	T4	37,20 <sub>abc</sub>
	6	T2	39,20 <sub>abc</sub>
	6	T1	45,87 <sub>bc</sub>
14	6	T2	32,77 <sub>a</sub>
	6	T3	34,45 <sub>a</sub>
	6	T1	38,37 <sub>a</sub>
	6	T4	38,82 <sub>a</sub>
	6	T5	43,33 <sub>a</sub>

<sub>abc</sub> Valores de média na mesma coluna sem subscrito comum diferem significativamente ( $p > 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

<sup>1</sup> dias após a infecção

<sup>2</sup> número de animais por tratamento sendo um por repetição

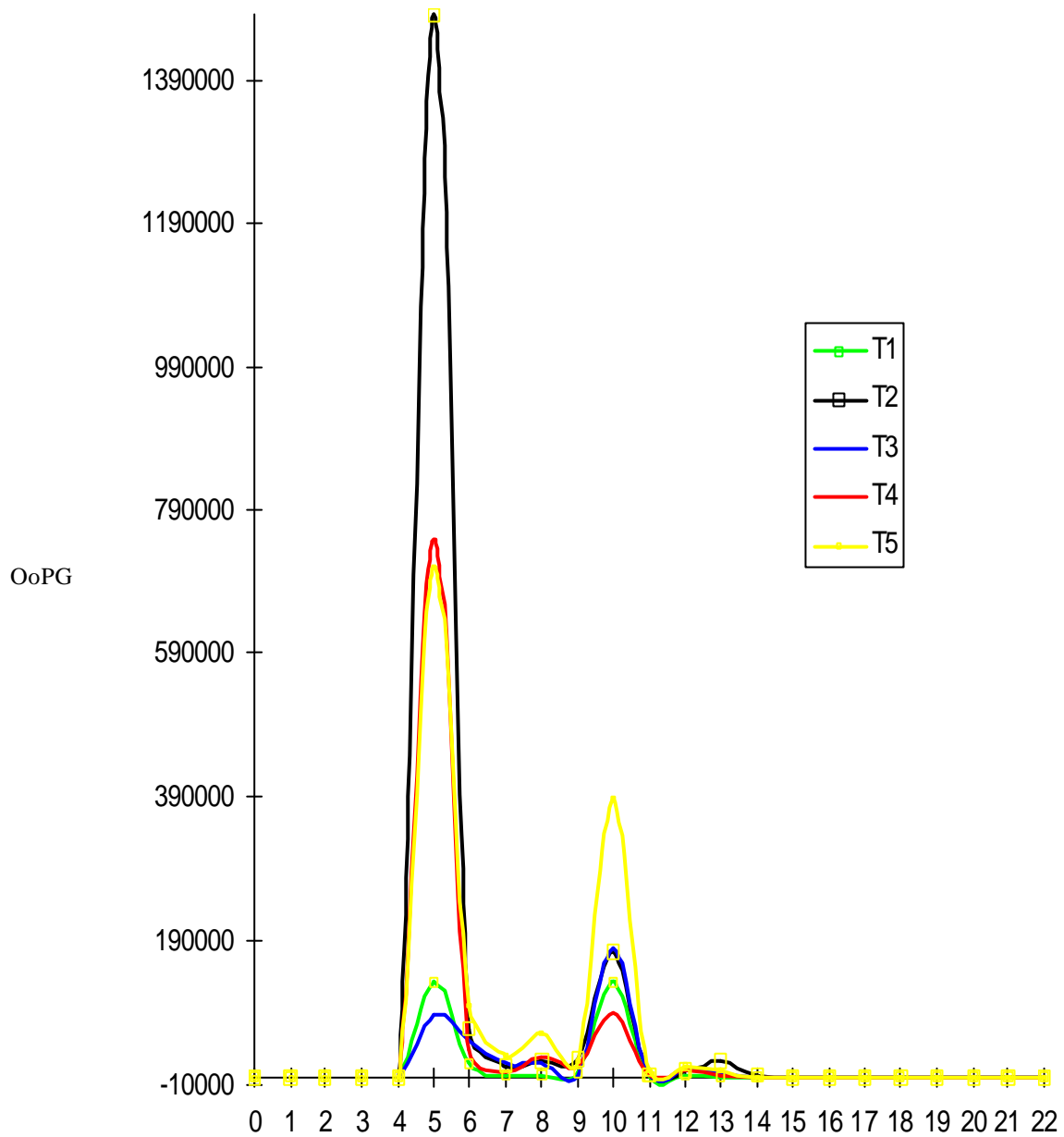
<sup>3</sup> T1) Salinomicina + penicilina G potássica, T2) Controle positivo, T3) betaína 0,05%, T4) betaína 0,1% e T5) betaína 0,15%.

### 4.1.3 Produção de Oocistos

Nesta avaliação não foi realizada análise estatística devido aos problemas surgidos durante a coleta de material fecal. Ainda assim, através do gráfico (Figura 7) pode ser observado que a eliminação de oocistos iniciou no dia no 4° DAI e chegou a quase zero no 22° DAI em todos os tratamentos. Durante este período, também de forma semelhante entre os grupos ocorreram dois picos de eliminação sendo o primeiro no 5° DAI e outro no 10° DAI. Ficou claro que em relação ao grupo controle, o grupo contendo a medicação anticoccidiana (T1) foi superior aos demais na capacidade de limitar a eliminação de oocistos, seguido dos grupos T5, T4, e T3 que continham os três níveis de betaína na ração. Um fato interessante que foi observado é que entre três níveis de betaína houve uma tendência ao aumento da eliminação de oocistos na medida em que os níveis de betaína aumentaram. Uma hipótese para a ocorrência deste fato é que a betaína, sendo um aditivo capaz de melhorar o equilíbrio osmótico das células do hospedeiro, em doses mais elevadas poderá contribuir secundariamente para o controle osmótico no parasito e conseqüentemente melhorar seu potencial reprodutivo. Contudo as aves do grupo T1 eliminaram menos oocistos porque a medicação anticoccidiana utilizada, um ionóforo poliéter, atua comprometendo o equilíbrio osmótico do parasito e limitando a invasão e a reprodução das primeiras fases endógenas do parasito que afeta diretamente a produção de oocistos.

Entre os diversos parâmetros utilizados na avaliação da eficácia dos anticoccidianos a contagem de oocistos é considerada de pouca validade e muitas vezes controversa. O motivo pelo qual ela tem sido caracterizada dessa forma é a incoerência nos resultados com as contagens de oocistos. Reid (1975) concluiu que este método de avaliação é de pouca validade, pois enquanto em alguns experimentos o número de oocistos foi reduzido com o uso da medicação, em outros, aumentou substancialmente chegando a mais que o dobro eliminado pelas aves não medicadas. Atribuiu a isso uma série de fatores tais como o tipo de medicamento, a dose utilizada, a espécie de *Eimeria* em questão e principalmente o efeito de superpopulação ou “crowding effect” (FAYER, 1980). No entanto, a betaína possui propriedades distintas de um medicamento anticoccidiano e neste contexto é que sua atuação na produção de oocistos foi avaliada. Este dados corroboram com Waldenstedt et al. (1999) que observaram uma boa capacidade da betaína na eliminação de oocistos.

Conforme esperado, durante o primeiro exame *post-mortem* (0 DAI) não foram observadas lesões macroscópicas sugestivas de coccidiose. Posteriormente quando realizada a segunda necropsia no 4° DAI, lesões foram encontradas, repetindo-se este achado continuamente conforme se realizaram as demais necropsias. Assim como de característica para *E. acervulina*, as lesões localizaram-se principalmente na porção anterior do trato digestivo confinadas ao duodeno e algumas vezes se estendendo até a região do jejuno e íleo. As lesões iniciais eram como pequenas placas esbranquiçadas dispersas ao longo do órgão, evoluindo com o tempo para lesões de aspecto branco-amarelado ou totalmente amarelado. Externamente na superfície da serosa foi possível se observar lesões que pareciam pequenas manchas quando posicionadas contra a luz, mas pouco evidente onde a espessura da parede estava aumentada. A mucosa intestinal dos animais teve alterações acentuadas quanto à espessura logo no início da infecção, apresentando espessamento e produção de muco intenso já no 4° DAI. Foi também observado áreas hiperêmicas e algumas petéquias no 7° DAI. No entanto, considerando-se a patogenicidade do isolado utilizado e a severidade da doença, isto foi inesperado. Nas aves necropsiadas no 14° DAI as lesões características de *E. acervulina* não foram mais observadas apesar do intestino delgado permanecer ainda com um pouco de espessamento e muco.



DAI

**Figura 7.** Produção de oocistos por grama de fezes durante a infecção experimental com *Eimeria acervulina*. T1) Salinomicina + penicilina G potássica; T2) controle positivo; T3) betaína 0,05%; T4) betaína 0,10%; T5) betaína 0,15%.

## 4.2 Patologia

### 4.2.1 Escore de lesões

Ao efetuar o escore de lesões observou-se grande semelhança no grau das lesões entre os grupos experimentais, não havendo diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando confrontados os dados da pontuação (Tabela 3). Pode-se observar que mesmo sem diferença significativa no 4º DAI o grupo controle positivo obteve uma pontuação mais elevada, indicando maior severidade da infecção nas aves desse grupo, enquanto o grupo tratado com betaína 0,05% obteve a melhor resposta a infecção devido ao menor escore. Já no 7º DAI, o grupo que obteve a melhor resposta foi àquele cuja suplementação de betaína foi de 0,1% (T4), permanecendo juntamente com T1 o grupo T2 como o maior afetado no escore de lesão. Uma observação importante a ser feita é que durante o exame, dentro de um mesmo grupo experimental foi possível notar uma grande variação, ocorrendo lesões pontuadas de +1 a +3 (Figura 8) no mesmo grupo.

**Tabela 3.** Valores médios do escore de lesões em frangos de corte experimentalmente infectados com *Eimeria acervulina*.

DAI <sup>1</sup>	TRATAMENTOS <sup>2</sup>				
	T1	T2	T3	T4	T5
0	-	-	-	-	-
4	1,2 <sub>a</sub>	1,5 <sub>a</sub>	0,7 <sub>a</sub>	1,2 <sub>a</sub>	1,2 <sub>a</sub>
7	2,3 <sub>a</sub>	2,2 <sub>a</sub>	1,7 <sub>a</sub>	1,5 <sub>a</sub>	2,0 <sub>a</sub>
14	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>Valores de média na mesma linha sem subscrito comum diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

<sup>1</sup> dias após a infecção

<sup>2</sup> T1) Salinomicina + penicilina G potássica, T2) Controle positivo, T3) betaína 0,05%, T4) betaína 0,1% e T5) betaína 0,15%.

Ainda, muitas variações ocorreram em relação aos dias de avaliação. Por exemplo, no 4º DAI, as lesões observadas nas aves do grupo controle (T2) que só recebeu a dieta basal eram aparentemente mais severas e características, apresentando mais muco e espessamento considerável da mucosa, enquanto que no grupo T3 observou-se poucas lesões.

Posteriormente os grupos T3 e T5, no 7º DAI, começaram a ter lesões de maior severidade, enquanto os outros grupos tiveram lesões brandas.

De acordo com estes resultados observa-se que embora em determinados momentos o escore de lesão tenha sido melhor em alguns grupos tratados com a betaína, não se pode atribuir definitivamente a este aditivo uma ação efetiva na diminuição das lesões de coccidiose no intestino delgado e o fato de existirem poucos trabalhos que abordaram tal questão dificulta ainda mais esta discussão. Virtanen et al. (1996) reportaram a redução no escore de lesão de aves alimentadas com betaína associada a salinomicina, porém Remus e Virtanen (1996) não observaram quaisquer efeitos positivos. Mathews et al. (1997) também observaram a diminuição no escore de lesão quando combinaram betaína 0,1% com coccidiostático inóforo, monensina a 55-110ppm na ração, mas observaram maior gravidade no escore de lesões de algumas aves quando utilizaram apenas a betaína como aditivo durante a infecção experimental.



**Figura 8.** Duodeno de frangos de corte. Lesões por *Eimeria acervulina* (? ) pontuadas em +1 (lesões dispersas) A; +2 (lesões agrupadas) B e +3 (lesões coalescentes) C.

#### 4.2.2 Histopatologia

Durante a análise do material da primeira necropsia (O DAI) não foram observadas quaisquer lesões ou formas endógenas dos parasitos estando as vilosidades intestinais normais com epitélio e borda em escova íntegros. A partir do 4º DAI algumas lesões começaram a serem observadas variando desde lesões do tipo descamativa da mucosa até fusões de vilosidades.

De modo geral, as formas endógenas observadas foram predominantemente trofozoítos pequenos arredondados e localizados no ápice das vilosidades intestinais, algumas vezes tão numerosos que se agrupavam em fileiras ou cachos (Figura 9A). Poucos esquizontes puderam ser observados neste período, pois estando ainda no início de sua formação, eram bem pequenos e de difícil visualização mesmo em objetiva de imersão (Figura 9B).

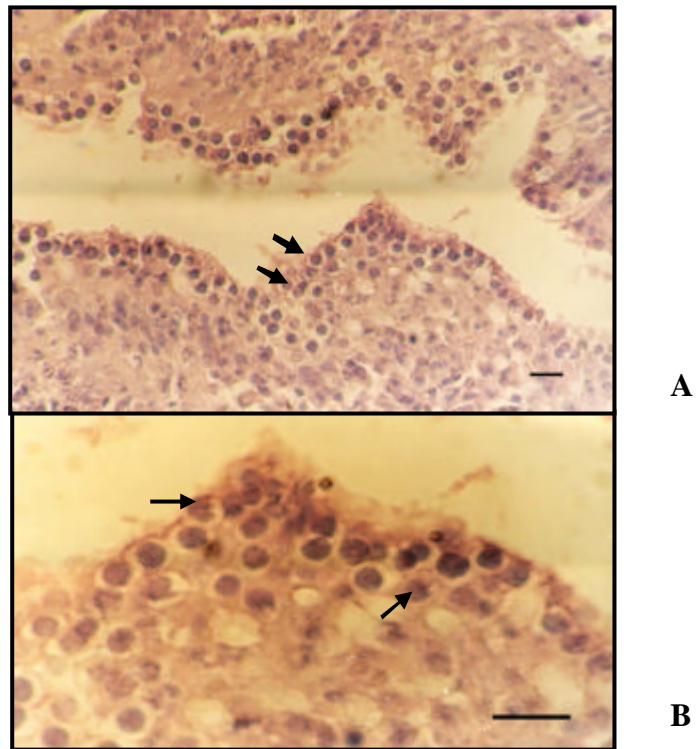
Com relação aos grupos experimentais, excetuando-se T2 um pouco mais afetado, não foi possível determinar maior severidade para um ou outro grupo recebendo os tratamentos, pois embora em alguns cortes histológicos as lesões e os parasitos em desenvolvimento fossem mais numerosos, tal diferença ocorria também entre animais de um mesmo grupo. Nos cortes em que a estrutura geral das vilosidades estava danificada, eram comuns as fusões e o espessamento das vilosidades (Figura 10). Em algumas áreas observaram-se edema e infiltrado inflamatório intenso caracterizado principalmente por linfócitos e heterófilos. Embora não tenha sido quantificada, aparentemente o número de células caliciformes estava aumentado nas áreas mais parasitadas.

A partir do 7º DAI a presença de trofozoítos e esquizontes deram lugar às formas endógenas em fase sexuada caracterizadas pela presença de macro e microgametócitos, zigotos e oocistos imaturos (Figura 11). Neste período a lesão mais comumente encontrada foi o achatamento da mucosa, com fusão e encurtamento das vilosidades (aspecto polipóide). A erosão do epitélio era constante nas áreas com intensa formação e liberação de oocistos, algumas vezes observada em locais sem a presença de parasitos. Em algumas regiões foi comum observar que a camada submucosa estava hipertrofiada, além de abrigar células inflamatórias constituídas principalmente de linfócitos.

No 14º DAI a estrutura da mucosa intestinal das aves tinha ainda bastante comprometimento com espessamento, fusões e encurtamento das vilosidades. Apesar disso as formas endógenas do parasito diminuíram drasticamente se aproximando de zero.

Embora a observação do desenvolvimento parasitário e das lesões microscópicas tenha sido fundamental no apoio ao diagnóstico, é uma avaliação muito subjetiva onde não há padrão de comparação quantitativa como para o escore de lesão, não podendo ser analisada entre tratamentos. Sendo assim, aqui foi utilizada de forma qualitativa para identificar os principais tipos de lesões e a morfologia dos estágios endógenos encontrados. Além de tudo não existem trabalhos relacionando diretamente os efeitos da betaína com a patologia microscópica. Sendo assim pode-se inferir apenas que a ocorrência de lesões bem como a morfologia do parasito permaneceu semelhante entre os tratamentos, e associando-se este fato com os demais dados da patologia pode-se sugerir que a atuação da betaína e da salinomicina foi semelhante com base na microscopia óptica. Ainda que não existam trabalhos utilizando a histopatologia, alguns pesquisadores (KETTUNEN et al., 2001a e 2001b; FETTERER et al., 2003) se preocuparam em avaliar o efeito intracelular da betaína, o que pode ser de utilidade no entendimento dos resultados encontrados. Sabe-se que a betaína dietética é absorvida principalmente na porção proximal do intestino delgado acumulando-se em maior concentração no duodeno onde poderá exercer modulação do movimento de água através das membranas celulares melhorando a osmorregulação. Neste caso aves infectadas por *E. acervulina* teoricamente teriam mais chances de obter benefícios com o controle osmótico e responder melhor a infecção.

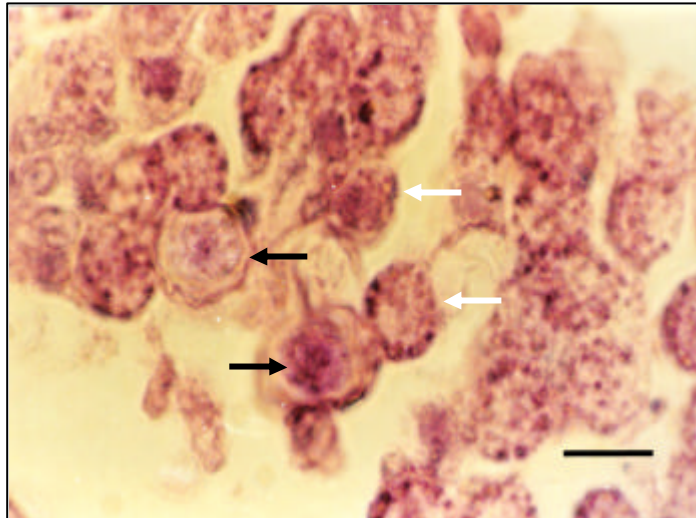




**Figura 9.** Formas endógenas ( ? ) de *Eimeria acervulina* no duodeno de frangos de corte no 7° dia após a infecção, T2 (controle positivo). A) trofozoítos, B) pequenos merontes. HE, (escala= 10µm).



**Figura 10.** Duodeno de frangos de corte. Lesão caracterizada por fusão e encurtamento das vilosidades ( ? ) no 14° dia após a infecção, T5 (betaína 015%). HE, 40x.



**Figura 11.** Formas endógenas de *Eimeria acervulina* no duodeno de frangos de corte no 7º dia após a infecção, T2 (controle positivo). Setas brancas (zigotos), setas pretas (oocistos imaturos). HE, (escala= 10µm).

#### 4.2.3 Morfologia das Vilosidades Intestinais

De uma forma geral observou-se que o maior impacto da coccidiose sobre a morfologia da mucosa duodenal ocorreu no 7º DAI onde o aumento na profundidade das criptas foi observado (Tabela 4). Conseqüentemente nesta data a relação vilosidade/cripta (v/c) foi pior em todos os grupos, mas embora isso signifique menor capacidade de absorção de nutrientes para o hospedeiro não esteve associada ao ganho de peso das aves, indicando um efeito compensador em outros seguimentos do intestino. Essa condição foi mais acentuada no grupo controle positivo (T2) e se repetiu até a última análise que permaneceu com valores de v/c menores. Embora isto seja verdadeiro, nota-se que antes ou após a infecção a diferença entre os grupos experimentais não foi significativa ( $p > 0,05$ ) com exceção do grupo T3 em relação ao T4 no 7º DAI. Esses resultados diferem em parte daqueles encontrados por Kettunen et al. (2001a) que observaram no 7º DAI uma melhoria na relação v/c no jejuno de aves infectadas com *E. maxima*, e também por Klasing et al. (2001) que relataram efeito modulador da betaína 0,1% na patogenia da infecção por *E. acervulina* através da redução no encurtamento das vilosidades.

Sendo assim, embora a quantidade de parasitos administrada para produzir uma infecção moderada fosse suficiente para causar alterações na morfologia da mucosa duodenal no 7º DAI, nas condições experimentais desta pesquisa não pôde ser observada diferença ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos aplicados. O raciocínio aplicado anteriormente na interpretação da histopatologia deve ser aplicado aqui, pois ainda que o efeito da betaína na mucosa duodenal tenha sido reduzido, é semelhante ao efeito da medicação anticoccidiana na promoção de uma resposta à infecção pelo hospedeiro.

**Tabela 4** Valores médios de altura de vilosidades, profundidade de cripta e relação cripta/vilo do intestino de frangos de corte.

DAI <sup>1</sup>	TRATAMENTOS <sup>2</sup>	VALORES (µm)		V/C
		VILO	CRIPTA	
0	T1	1212,13 <sub>a</sub>	153.97 <sub>a</sub>	8.45 <sub>a</sub>
	T2	1192,93 <sub>a</sub>	143.90 <sub>a</sub>	8.80 <sub>a</sub>
	T3	1263.68 <sub>a</sub>	137.53 <sub>a</sub>	9.43 <sub>a</sub>
	T4	1258.83 <sub>a</sub>	176.48 <sub>a</sub>	8.53 <sub>a</sub>
	T5	1327.98 <sub>a</sub>	154.83 <sub>a</sub>	9.45 <sub>a</sub>
4	T1	1349.80 <sub>a</sub>	139.97 <sub>a</sub>	10.62 <sub>a</sub>
	T2	1257.55 <sub>a</sub>	144.08 <sub>a</sub>	9.37 <sub>a</sub>
	T3	1423.57 <sub>a</sub>	147.85 <sub>a</sub>	9.95 <sub>a</sub>
	T4	1384.57 <sub>a</sub>	168.42 <sub>a</sub>	8.78 <sub>a</sub>
	T5	1391.12 <sub>a</sub>	162.27 <sub>a</sub>	8.88 <sub>a</sub>
7	T1	1193.68 <sub>ab</sub>	282.10 <sub>a</sub>	4.30 <sub>a</sub>
	T2	1125.03 <sub>ab</sub>	312.22 <sub>a</sub>	3.75 <sub>a</sub>
	T3	1242.22 <sub>b</sub>	310.20 <sub>a</sub>	4.18 <sub>a</sub>
	T4	962.98 <sub>a</sub>	290.63 <sub>a</sub>	3.42 <sub>a</sub>
	T5	1100.43 <sub>a</sub>	295.65 <sub>a</sub>	4.12 <sub>a</sub>
14	T1	1334.47 <sub>a</sub>	154.65 <sub>a</sub>	9.33 <sub>a</sub>
	T2	1606.35 <sub>a</sub>	218.83 <sub>a</sub>	7.70 <sub>a</sub>
	T3	1635.48 <sub>a</sub>	191.75 <sub>a</sub>	9.05 <sub>a</sub>
	T4	1412.63 <sub>a</sub>	170.87 <sub>a</sub>	8.48 <sub>a</sub>
	T5	1641.23 <sub>a</sub>	194.67 <sub>a</sub>	9.20 <sub>a</sub>

<sup>abc</sup>Valores de média na mesma coluna sem subscrito comum diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

<sup>1</sup>dias após a infecção

<sup>2</sup>T1) Salinomicina + penicilina G potássica, T2) Controle positivo, T3) betaína 0,05%, T4) betaína 0,1% e T5) betaína 0,15%.

## **CAPÍTULO II**

### **BIOLOGIA DE *Eimeria acervulina* EM FRANGOS DE CORTE EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS E SUPLEMENTADOS COM BETAÍNA**

## 1 INTRODUÇÃO

A betaína é um composto químico amplamente encontrado na natureza sendo sintetizada por uma grande variedade de microrganismos e plantas. Seu acúmulo nas células é capaz de conferir proteção contra o estresse osmótico por permitir a continuidade da atividade metabólica em condições que normalmente inativariam as células (PETRONINI et al., 1992; AUGUSTINE et al., 1997). Baseando-se nessa propriedade é que surgiram as primeiras explicações para os efeitos positivos do uso da betaína como aditivo para animais submetidos a condições que levam ao estresse osmótico de suas células, tal como na coccidiose aviária. Porém, baseando-se neste mesmo mecanismo, é possível levantar questões que outrora contribuiriam para uma visão negativa do uso desse composto. Como exemplo, numa hipótese de que a manutenção do equilíbrio osmótico nas células do hospedeiro ocorresse concomitantemente ao equilíbrio osmótico da célula do parasito, ambos os organismos estariam sendo beneficiados, sendo o último mais ainda beneficiado pela manutenção de mais células sadias do hospedeiro para seu desenvolvimento e multiplicação. No entanto os resultados práticos têm demonstrado que de uma forma geral, o hospedeiro leva mais vantagem com o equilíbrio osmótico, e mesmo em situações onde comprovadamente o desenvolvimento dos coccídios fora beneficiado pelo uso da betaína, a melhora no desempenho dos animais e a redução do aparecimento de sinais clínicos prevaleceu. Os estudos de Augustine et al. (1997) e Augustine e Danforth (1999) foram os únicos, até o momento, conduzidos com o objetivo de avaliar não só os efeitos do uso da betaína para o organismo do hospedeiro como também seu efeito para os coccídios. Embora tenham avaliado a capacidade dos esporozoítos e o desenvolvimento dos estágios endógenos *in vitro* e *in vivo*, não direcionaram seu estudo para as possíveis alterações morfológicas ocorridas em cada fase do ciclo de vida, bem como não alterações biológicas associadas às fases dos parasitos.

O presente estudo visou avaliar o efeito do uso da betaína na biologia dos estágios evolutivos de *E. acervulina* através do estudo da morfologia dos oocistos e fases endógenas e estudo do desenvolvimento do parasito através dos períodos parasitológicos durante a infecção experimental.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Biologia dos Estágios Evolutivos em *Eimeria*

O conhecimento da biologia dos coccídios evoluiu muito nas últimas décadas e continua até hoje. Em meio aos inúmeros avanços ocorridos se destacaram às descobertas acerca do ciclo de vida, que inicialmente representava apenas uma seqüência de simples estágios, os quais posteriormente se tornaram peças-chaves tanto para a identificação das espécies quanto para a caracterização da patogenia. As espécies do gênero *Eimeria* podem ser caracterizadas pela estrutura dos oocistos, estrutura dos estágios endógenos, espécie do hospedeiro, localização dos estágios endógenos no hospedeiro e pela especificidade (FAYER, 1980). No entanto o critério mais utilizado para a diferenciação é ainda a estrutura do oocisto, que em muitas situações pode ser o único alvo disponível para o diagnóstico (DUSZYNSKY; WILBER, 1997). Aproximadamente um terço de todas as espécies descritas dentro do filo Apicomplexa pertence à família Eimeriidae, cuja maioria foi descrita baseando-se unicamente na morfologia dos oocistos (BANDONI; DUSZYNSKI, 1988). Levine (1973) citou, no entanto que o tamanho dos oocistos pode variar segundo o estado de patência e nesses casos, uma sobreposição morfométrica poderá ocorrer. Ao discutir outros aspectos inerentes a identificação em *Eimeria*, Long e Joyner (1984) relataram que as diferenças morfológicas e fisiológicas observadas nos coccídios expressam as alterações bioquímicas e fisiológicas ocorridas durante seu desenvolvimento. Sendo assim é possível considerar que não só para a diferenciação das espécies serviu o estudo da morfologia, pois uma vez alterados os padrões morfológicos das diversas fases evolutivas, poderão ser atribuídas modificações bioquímicas causadas conseqüentemente por algum tipo de tratamento durante o desenvolvimento do hospedeiro. Com base nestes fatos, é possível considerar também que o uso de certos produtos químicos direcionados ao controle da coccidiose pode afetar o desenvolvimento do parasito refletido em alterações biológicas dos estágios do ciclo de vida como as modificações da morfologia ou no retardo do desenvolvimento, avaliados através dos períodos parasitológicos. É sabido que o controle da coccidiose em operações comerciais até o momento é baseado na quimioterapia, na qual são utilizados basicamente dois tipos de drogas. O primeiro grupo corresponde aos compostos clássicos, produzidos por síntese química, e que atuam principalmente em nível do metabolismo mitocondrial. Já os ionóforos poliéteres são sintetizados através da fermentação de microorganismos, e atuam ao nível dos esporozoítos, trofozoítos e demais fases endógenas causando distúrbios no transporte de íons monovalentes ( $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ) através da membrana celular do coccidio, exaurindo a bomba de sódio e potássio e interferindo na produção de energia, o que causa a morte do parasito (CASTRO, 2000). Atualmente os compostos ionóforos são os mais utilizados no controle anticoccidiano na indústria avícola mundial. Logo, é possível que o uso contínuo dessas drogas cause alterações na biologia que podem ser verificadas através do estudo de parâmetros tais como o tamanho médio dos oocistos e fases endógenas bem como os períodos pré-patente e patente da infecção.

Dentre os métodos utilizados para a caracterização morfológica das fases do ciclo evolutivo de *Eimeria* destaca-se o trabalho de Duszynski e Wilber (1997), que enfatizaram a precisão na descrição de espécies por meio de uma detalhada observação das estruturas morfológicas. Tal caracterização baseia-se na observação de estruturas internas e principalmente na mensuração de uma grande quantidade de oocistos esporulados. Esta mensuração é feita em todos os estágios evolutivos através da obtenção de valores médios do comprimento ou diâmetro maior e da largura ou diâmetro menor (TEIXEIRA, 2003). Esses

dados também são considerados para os esporocistos. A razão entre as duas medidas dos oocistos, o índice morfométrico, revela alterações na estrutura típica de cada espécie. Assim, a espécie cujo diâmetro maior do oocisto (DM) é maior que o diâmetro menor (Dm) será incluída dentro do formato alongado, conhecido em morfologia como elipsoidal. Na medida em que a razão entre as medidas se aproxima de 1, isto é, o DM se aproxima do Dm, determinará as formas subesféricas. Neste aspecto o formato esferoidal corresponderá ao índice morfométrico exatamente igual 1. A importância desse parâmetro para o presente trabalho será discutida mais adiante.

## **2.2 Influência da Betaína no Desenvolvimento e na Estrutura de Estágios Evolutivos de *Eimeria***

Até o momento poucos trabalhos foram delineados com o objetivo de se avaliar o efeito direto da betaína no metabolismo e desenvolvimento parasitário de *Eimeria*. Neste campo se destacaram as pesquisas realizadas por Augustine et al. (1997) e Augustine e Danforth (1999), que por serem as únicas referências relacionadas mais diretamente com o presente trabalho, servirão como base para esta revisão.

Augustine et al. (1997) avaliaram concomitantemente a influência da betaína no desempenho de aves desafiadas com uma cultura mista de espécies de *Eimeria*, e na capacidade de invasão e desenvolvimento dos estágios evolutivos de *E. tenella* e *E. acervulina* *in vitro* e *in vivo*. Para tanto estes pesquisadores realizaram um experimento com aves em baterias e cama, alimentadas com diferentes níveis de betaína adicionados ou não de salinomicina, e infectadas com uma suspensão de oocistos esporulados contendo as três espécies mais comuns de coccídios das aves, *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*. Para avaliar a toxicidade no parasito *in vitro* colocaram esporozoítos de *E. acervulina* e *E. tenella* numa suspensão com crescentes concentrações de betaína inoculando-os a seguir em cultura de células onde a capacidade de invasão foi avaliada. O desenvolvimento em cultura de células e o ensaio *in vivo* foram analisados através da observação do parasito por microscopia. Como resultado foi observado que além do incremento no desempenho dos animais, a betaína sozinha ou com salinomicina foi capaz de afetar *in vivo* e em qualquer concentração a invasão dos esporozoítos de ambas as espécies testadas. De forma contrária quanto ao desenvolvimento, *E. tenella* não foi afetada negativamente pela adição da betaína e salinomicina, porém *E. acervulina* teve seu desenvolvimento reduzido em aves alimentadas com os dois aditivos. Os resultados do ensaio *in vitro* mostraram que havia incapacidade da betaína em afetar a mobilidade e a morfologia dos esporozoítos de ambas as espécies, bem como de alterar a capacidade de invasão destes parasitos na cultura de células.

Augustine e Danforth (1999) avaliaram, entre outros parâmetros, a influência da betaína e da salinomicina na ultraestrutura das células intestinais e no desenvolvimento dos estágios evolutivos do parasito, em aves de corte infectadas experimentalmente por *E. acervulina*. Para tanto eles utilizaram a microscopia eletrônica e observaram que em todos os tratamentos utilizando a betaína pura ou com salinomicina, as células intestinais eram menos eletrodensas do que as células do grupo sem suplementação de betaína. Ainda, observaram nos merozoítos do grupo tratado com salinomicina que havia extensa vacuolização e ruptura de membrana, o que foi prevenido com a suplementação da betaína. Também numerosos merozoítos e merontes (=esquizontes) intactos foram vistos no lúmen intestinal das aves alimentadas com dieta contendo salinomicina e betaína.

### 2.3 A Seqüência de Fibonacci, a Proporção Áurea e sua Aplicação Biológica

Datam de muitos anos os estudos baseados na observação das relações e modelos numéricos que apareciam na natureza. Dentre tantos se destacou o estudo da seqüência de Fibonacci e da razão áurea cujas aplicações invadiram desde o ramo das artes e da arquitetura até a biologia.

A seqüência numérica de Fibonacci corresponde a uma seqüência definida como recursiva pela fórmula  $f(N) = [1, 1, 2, 3, 5, 8, 13, 21, 34, 55, 89, 144, 233, 377, \dots]$ . Na prática, iniciando-se pelos números 0 e 1, produz-se o próximo número da seqüência, somando os dois anteriores. Assim,  $0+1=1$ ,  $1+1=2$ ,  $2+1=3$ , etc (BARISON, 2005).

Esta seqüência foi descrita primeiramente pelo matemático [Leonardo de Pisa](#) também conhecido como Fibonacci (c. 1200), que no seu livro *Liber Abacci* (livro do Abaco, 1228) descreveu entre outras teorias, um modelo matemático para o crescimento de uma população de coelhos (SODRÉ, 2005). A taxa de crescimento dos números de Fibonacci, que é  $F(n+1)/F(n)$ , tende a uma razão numérica chamada [proporção áurea](#) ou número de ouro representado pela letra grega  $\phi$  (Phi). Sendo extraído da seqüência de [Fibonacci](#) este número representa a proporção da sucessão numérica descrita anteriormente que é de aproximadamente 1,618. É considerado a constante do crescimento e pelo fato de ser muito freqüente na natureza se tornou alvo de pesquisadores, artistas e escritores.

Conforme descrito por Huntley (1985) e Barison (2005), a proporção áurea está presente no corpo humano e no universo de diversas formas. A exemplo disso, cita-se a proporção entre abelhas fêmeas e machos em qualquer colméia é 1,618. Assim como nas abelhas, estudos genealógicos com coelhos apontam uma seqüência áurea. Também a proporção com que o raio do interior da concha do caramujo *Nautillus* cresce é de 1,618. A proporção entre a medida do ombro humano à ponta do seu dedo médio e a medida do seu cotovelo à ponta do seu dedo também é de 1,618 bem como diversas outras proporções anatômicas representadas pelo "Homem Vitruviano", obra de Leonardo Da Vinci e também no "Le Modulor" do francês Le Corbusier sobre os valores de ocupação do corpo humano também estão baseados em Phi. A Filotaxia demonstra que muitas plantas mostram os números de Fibonacci no crescimento de seus galhos e no arranjo das folhas onde o padrão helicoidal é estudado e cuja importância remonta desde o equilíbrio dos ramos até a incidência de raios luminosos. Na física o comportamento dos átomos e o comportamento da luz demonstram interação com a seqüência, sem contar as descobertas no ramo das probabilidade, estatística e das ciências econômicas (RON, 2005).

Sendo assim, e baseando-se nos fatos históricos, é provável que a proporção áurea e os números de Fibonacci tenham relação e aplicabilidade numa infinidade de situações biológicas na natureza relacionadas ao crescimento e desenvolvimento dos seres vivos.

É fato que em muitos casos na biologia a classificação de espécies depende da diferenciação morfológica. Esta se baseia em técnicas de mensuração que possibilitam o acesso a valores numéricos de estruturas que caracterizam as espécies de um grupo de organismos. No filo Apicomplexa e mais especificamente na família Eimeriidae, a classificação morfológica baseada na mensuração das estruturas tem sido fundamental. Desta forma, dispondo-se de muitos valores numéricos, é possível que a aplicação de modelos matemáticos para auxiliarem na caracterização. Teixeira (2003) faz referência as metodologias que vêm sendo apresentadas como solução dos problemas encontrados na análise morfométrica de parasitos como as aplicações matemáticas, estatísticas e análise computadorizada, tais como Kucera; Reznicky (1991), Dauschies et al. (1999) e Pereira et al. (2001). Dentre os muitos parâmetros da diferenciação morfológica em *Eimeria* o índice morfométrico (razão entre os diâmetros) tem um papel importante, pois caracteriza o formato do oocisto. A espécie, *E. acervulina*, tem caracteristicamente um índice morfométrico que



muito de se aproxima do valor de Phi (1,618) e desta forma, se investigada será possível o estabelecimento de uma relação entre a constante de crescimento e o desenvolvimento desta espécie.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Tempo de Esporulação

Depois de observada a presença dos primeiros esporozoítos totalmente formados no interior dos esporocistos o tempo de esporulação mínimo foi considerado completo (LONG; JOYNER, 1976). Já o tempo máximo de esporulação foi dado quando a quantidade de oocistos esporulados não mais aumentou e conseqüentemente o percentual de esporulação tornou-se estável e no seu nível máximo. Assim, a avaliação do tempo de esporulação corresponde às observações diárias do pool de amostras de todos os tratamentos e suas repetições, sendo a determinação do percentual de esporulação observado até a estabilização do processo de esporogonia.

*Procedimento:* Para a análise foi utilizado um “pool” de amostras fezes de cada tratamento coletadas do 4° ao 14° DAI. Estas eram filtradas em tamises cobertos com gaze de algodão dobrada para remoção de resíduos maiores e a seguir distribuídas em placas de Petri contendo solução de dicromato de potássio a 2% na proporção 5:1 v/v, mantidas à temperatura do laboratório (20-25°C), onde as placas eram parcialmente tampadas para permitir a aeração. As amostras foram avaliadas sucessivamente por um período de sete dias através da técnica de centrifugação em solução saturada de açúcar. A cada análise o percentual de esporulação foi dado pela observação total de cem oocistos por amostra.

### 3.2 Períodos parasitológicos (LEVINE, 1985)

*Período pré-patente:* Dado pelo intervalo de tempo compreendido entre o início da infecção e o início da eliminação dos primeiros oocistos nas fezes.

*Período patente:* Dado pelo intervalo de tempo compreendido entre a infecção das aves e término da eliminação de oocistos.

### 3.3 Morfologia dos Estágios Evolutivos

O estudo morfológico dos parasitos foi realizado através da mensuração dos oocistos e formas endógenas. Para ambas as avaliações foi utilizado um microscópio binocular Carl Zeiss acoplado de ocular micrométrica K-15x-PZO (Polônia). Os oocistos utilizados na mensuração foram obtidos a partir do “pool” de fezes coletadas nos dias de maior eliminação. As lâminas contendo os oocistos eram examinadas em aumento de 1000x, sendo mensurados 100 oocistos esporulados oriundos de cada grupo experimental. Foram consideradas as medidas dos diâmetros maior e menor dos oocistos, diâmetros maior e menor dos esporocistos e a razão entre os diâmetros (TEIXEIRA, 2003). Para a mensuração das formas endógenas as lâminas de cortes histológicos foram examinadas em aumento de 400x ou 1000x. Considerando-se o período de coleta de material para a histologia, as formas endógenas mensuradas foram àquelas presentes em maior abundância no material, sendo os trofozoítos presentes no 4° DAI e os macrogametócitos no 7° DAI. Ao todo foram mensuradas 30 dessas formas endógenas para cada tratamento sendo considerados os valores dos diâmetros maior e menor. O índice morfométrico dos oocistos foi determinado matematicamente pela razão entre os diâmetros dos oocistos esporulados.

### **3.4 Relacionando a Morfologia de *Eimeria acervulina* com Phi**

Conforme descrito anteriormente o número de ouro (Phi) é uma constante que representa a proporção da sucessão numérica de Fibonacci e é de aproximadamente 1,618. É considerada uma constante do crescimento devido à taxa de crescimento de seus números e para relacioná-la com o desenvolvimento de *E. acervulina* os dados obtidos com a mensuração foram utilizados calculando-se razões matemáticas com os valores médios das variáveis diâmetro maior e diâmetro menor de oocistos e esporocistos. Valores da razão de duas variáveis próximos de Phi indicaram a relação entre Phi e o desenvolvimento dessas variáveis. A seguir as variáveis foram submetidas à análise estatística para verificar a interferência dos tratamentos na razão matemática relacionada a Phi.

### **3.5. Análise Estatística**

A análise estatística dos dados foi realizada conforme Sampaio (2002) com auxílio do programa SISVAR versão 4.6 (FERREIRA, 2000) para análise de variância e comparação de médias.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Tempo de Esporulação

Os dados da análise do tempo de esporulação estão apresentados na tabela 1 onde se observa que em todos os tratamentos o tempo de esporulação mínimo foi de aproximadamente 48 h. Embora houvesse alguma diferença no percentual de oocistos esporulados, a esporulação ocorrida até esta data foi bastante semelhante. Já, o tempo de esporulação máximo variou substancialmente entre os grupos, sendo mais curto no T3 (0,05% betaína) no 4° DAI e mais demorado no T5 (0,15% betaína) no 8° DAI. Nos demais grupos a esporulação máxima ou total foi atingida no 5° DAI.

O tempo de esporulação é considerado um importante fator para a diferenciação de espécies do gênero *Eimeria* (LONG; JOYNER, 1976), sendo rotineiramente utilizado para dar suporte ao diagnóstico de coccidiose. Embora seja característico em algumas espécies, pode variar substancialmente com a interferência de variáveis externas, tais como as variações do meio ambiente entre outros (FAYER, 1980). Graat et al. (1994) ao avaliarem a esporulação de *E. acervulina* sob diferentes condições ambientais, observaram que a temperatura e a umidade relativa não foram capazes de influenciar a taxa (%) nem o curso da esporulação, no entanto afetaram o seu início sendo a temperatura o fator mais importante. Diferentemente, no presente estudo foi apenas afetado o período final da esporulação, e sabendo-se que as condições ambientais foram idênticas para todos os grupos, pode-se descartar a hipótese de que tal alteração não se deveu a temperatura ou umidade. Embora uma explicação para a influência dos tratamentos na esporulação não possa ser dada no momento, considera-se importante tal observação que na prática se traduz em influência na epidemiologia da coccidiose, uma vez que a maior esporulação significa mais oocistos infectantes disponíveis. Joyner e Norton (1977) e Ruff et al. (1978; 1993) ao estudarem a influência de anticoccidianos no desenvolvimento dos oocistos de diversas espécies, relataram quedas expressivas na produção e na esporulação. Entretanto, não existem trabalhos relacionando o uso da betaína frente à esporulação de oocistos.

**Tabela 1.** Tempo de esporulação dos oocistos de *Eimeria acervulina*.

Tratamentos <sup>1</sup>	Tempo de esporulação em dias	% de esporulação
T1	Mín	2
	Máx	5
T2	Mín	2
	Máx	5
T3	Mín	2
	Máx	4
T4	Mín	2
	Máx	5
T5	Mín	2
	Máx	6

<sup>1</sup> T1) Salinomicina + penicilina G potássica, T2) Controle positivo, T3)betaína 0,05%, T4) betaína 0,1% e T5) betaína 0,15%.

## 4.2 Períodos Parasitológicos

Através da tabela 2 é possível se observar a eliminação de oocistos ocorrida nos diferentes tratamentos durante o período experimental. Nota-se que o início dessa eliminação ocorreu de forma igual para todos os grupos, mais precisamente começando no 4º DAI. Também de forma semelhante entre os tratamentos essa produção se prolongou até o 20º DAI aproximando-se de zero nas contagens feitas a partir desta data. Sendo assim, pode se afirmar que de uma forma geral os períodos pré-patente e patente não só foi característico com relação à espécie de *Eimeria* em questão (96h e 21 dias, respectivamente) como foram semelhantes entre os tratamentos, supondo não haver influência da betaína neste parâmetro.

**Tabela 2.** Eliminação diária de oocistos por grama de fezes durante o período experimental com *Eimeria acervulina*.

DAI	Tratamentos				
	T1	T2	T3	T4	T5
0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	364	384	160	504	512
5	131.000	1.480.000	86.000	750.000	710.000
6	19.000	67.700	52.700	39.900	100.000
7	2.400	15.100	18.100	5.100	29.400
8	3.400	21.000	19.000	30.000	62.700
9	5.300	27.000	4.200	16.600	21.400
10	131.000	173.000	180.000	89.000	386.000
11	267	3.067	2.334	3.400	5.867
12	2.000	10.300	7.800	9.800	15.400
13	560	21.400	5.960	1.420	10.580
14	967	1.530	800	267	200
15	120	890	160	115	510
16	133	395	28	333	890
17	13	29	125	12	12
18	46	12	37	12	50
19	42	4	12	8	8
20	12	37	21	25	1
21	1	1	1	1	1
22	1	0	0	0	1

### 4.3 Morfologia dos Estágios Evolutivos

Os dados da morfologia dos estágios evolutivos de *E. acervulina* estão apresentados na tabela 3. Conforme pode ser observado, a maior parte das variáveis correspondentes às fases endógenas do parasito não foi afetada significativamente pelos tratamentos, com exceção do diâmetro menor dos macrogametas do grupo T1 que foram maiores em relação aos do grupo T2 e T4.

**Tabela 3.** Morfologia dos estágios evolutivos de *Eimeria acervulina*.

FASE EVOLUTIVA	Variáveis	DIÂMETROS				Índice Morfométrico	
		Maior		Menor			
<i>Oocistos</i> N=100	Tratamentos	T2	15,33 <sub>a1</sub>	T2	11,93 <sub>a1</sub>	T2	1,29 <sub>a1</sub>
		T3	18,19 <sub>a2</sub>	T3	13,57 <sub>a2</sub>	T5	1,34 <sub>a2</sub>
		T5	18,68 <sub>a2 a3</sub>	T4	13,61 <sub>a2</sub>	T3	1,34 <sub>a2</sub>
		T4	18,69 <sub>a2 a3</sub>	T5	13,97 <sub>a2 a3</sub>	T1	1,35 <sub>a2</sub>
		T1	19,02 <sub>a3</sub>	T1	14,15 <sub>a3</sub>	T4	1,38 <sub>a2</sub>
<i>Esporocistos</i> N=100	Tratamentos	T2	6,36 <sub>a1</sub>	T2	4,10 <sub>a1</sub>	T3	1,58 <sub>a1</sub>
		T3	7,47 <sub>a2</sub>	T3	4,82 <sub>a2</sub>	T2	1,59 <sub>a1</sub>
		T1	7,77 <sub>a2 a3</sub>	T5	4,89 <sub>a2</sub>	T1	1,59 <sub>a1</sub>
		T5	7,82 <sub>a2 a3</sub>	T4	4,96 <sub>a2</sub>	T4	1,63 <sub>a1</sub>
		T4	7,97 <sub>a3</sub>	T1	4,99 <sub>a2</sub>	T5	1,63 <sub>a1</sub>
<i>Trofozoítos</i> N=30	Tratamentos	T2	3,88 <sub>a1</sub>	T2	3,59 <sub>a1</sub>	T5	1,09 <sub>a1</sub>
		T4	4,02 <sub>a1</sub>	T4	3,60 <sub>a1</sub>	T1	1,09 <sub>a1</sub>
		T1	4,15 <sub>a1</sub>	T5	3,83 <sub>a1</sub>	T2	1,09 <sub>a1</sub>
		T5	4,16 <sub>a1</sub>	T3	3,85 <sub>a1</sub>	T3	1,10 <sub>a1</sub>
		T3	4,27 <sub>a1</sub>	T1	3,88 <sub>a1</sub>	T4	1,12 <sub>a1</sub>
<i>Macrogametas</i> N=30	Tratamentos	T2	10,28 <sub>a1</sub>	T2	8,10 <sub>a1</sub>	T1	1,17 <sub>a1</sub>
		T1	10,32 <sub>a1</sub>	T4	8,19 <sub>a1</sub>	T2	1,29 <sub>a1</sub>
		T4	10,65 <sub>a1</sub>	T5	8,30 <sub>a1 a2</sub>	T4	1,30 <sub>a1</sub>
		T3	10,89 <sub>a1</sub>	T3	8,45 <sub>a1 a2</sub>	T3	1,31 <sub>a1</sub>
		T5	10,94 <sub>a1</sub>	T1	8,96 <sub>a2</sub>	T5	1,33 <sub>a1</sub>

a1 a2 a3 Valores sem subscrito comum diferem significativamente (p<0,05) pelo teste de Tukey.

Quanto aos oocistos, estes foram afetados em parte pelos tratamentos. O grupo T2 (controle positivo) teve oocistos menores (p<0,05) que dos demais grupos considerando-se o diâmetro maior e menor, além de um formato mais esférico baseando-se no índice morfométrico, provavelmente devido à menor produção de oocistos neste grupo. Diferentemente os oocistos do grupo T1 (Salinomocina) foram maiores (p<0,05) do que dos demais grupos com uma tendência ao formato elipsoidal. Já entre os oocistos dos três grupos tratados com a betaína não foi observada nenhuma diferença seja quanto ao tamanho ou quanto ao formato. Assim como nas fases endógenas os esporocistos foram pouco afetados pelos tratamentos sendo menores (p<0,05) no grupo T2 e maiores (p<0,05) no grupo T4 ambos com base no diâmetro maior.

#### 4.4 *Eimeria acervulina* e Phi

Conforme pode ser observado na tabela 4, a única razão matemática que se aproxima de Phi (1,618) é aquela obtida a partir dos diâmetros maior e menor dos esporocistos de *E. acervulina*, por estar relacionados ao crescimento de uma das fases do ciclo biológico, a esporogonia.

Tal fato indica, entre outros aspectos, que embora algumas variações morfológicas estivessem ocorrendo na parede dos oocistos, o desenvolvimento dos esporocistos que são formados na primeira etapa do processo de esporulação e conseqüentemente dos esporozoítos que são formados a seguir obedeceram a uma constante intimamente relacionada com Phi que como visto anteriormente é uma constante do crescimento observada em várias situações na natureza. Ainda, esta constante não foi afetada pelos tratamentos o que sugere a incapacidade dos tratamentos em afetarem o modo e a proporcionalidade em que os esporocistos se desenvolvem. Esta é a primeira vez que a constante de crescimento é relacionada com o desenvolvimento de organismos do gênero *Eimeria*.

**Tabela 4.** Valores médios obtidos de diversas variáveis da morfologia de *Eimeria acervulina* e suas razões matemáticas.

Variáveis*	TRATAMENTOS					Média geral
	T1	T2	T3	T4	T5	
DM	19,02	15,48	18,18	18,69	18,68	18,01
Dm	14,15	11,93	13,57	13,61	13,97	13,45
dM	7,77	6,36	7,47	7,97	7,82	7,48
Dm	4,98	4,10	4,82	4,96	4,89	4,75
DM/Dm	1,35	1,30	1,34	1,38	1,34	1,34
dM/dm	1,59 <sub>a1</sub>	1,59 <sub>a1</sub>	1,58 <sub>a1</sub>	1,63 <sub>a1</sub>	1,63 <sub>a1</sub>	1,60
DM/dM	2,51	2,51	2,47	2,38	2,43	2,46
DM/dm	3,89	3,85	3,84	3,82	3,89	3,86
Dm/dM	1,87	1,93	1,85	1,74	1,82	1,84
Dm/dm	2,89	2,97	2,87	2,79	2,91	2,89

\* DM=Diâmetro maior do oocisto, Dm=diâmetro menor do oocisto, dM=diâmetro maior do esporocisto, dm=diâmetro menor do esporocisto ( $\mu\text{m}$ ). Em dM/dm valores sem subscrito comum diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

## CONCLUSÕES

- 1) A betaína não foi capaz de interferir positivamente na resposta clínica das aves durante a infecção por *E. acervulina* baseando-se nos sinais clínicos, ganho de peso, consumo de ração e nível de proteínas plasmáticas, porém afetou positivamente a produção de oocistos, provavelmente devido às suas propriedades osmóticas;
- 2) A betaína não foi capaz de interferir na patologia da infecção com base nos dados do escore de lesão, histopatologia e desenvolvimento das vilosidades e,
- 3) Há possibilidade da utilização da betaína como aditivo na ração das aves em substituição aos medicamentos convencionais salinomicina e penicilina G potássica, cujos efeitos são semelhantes na recuperação do hospedeiro frente a coccidiose.
- 4) A betaína foi capaz de afetar parcialmente a biologia de *E. acervulina*, pois embora não tenha influenciado os períodos pré-patente e patente, afetou o tempo máximo de esporulação;
- 5) A betaína foi capaz de afetar a morfologia dos oocistos de *E. acervulina*, mas exerceu pouca influência na morfologia dos esporocistos e no desenvolvimento dos estágios endógenos com base na mensuração de trofozoítos e macrogametas e,
- 6) Existe uma grande relação entre a constante de crescimento Phi e o desenvolvimento biológico de *E. acervulina*, com base no crescimento dos esporocistos.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, P. C. Physiological Responses of Chicken Gut to Infection with *Eimeria acervulina*. **Avian Diseases**, v. 28, n. 4, p. 868-876, 1984.
- ALLEN, P. C.; DANFORTH, H. D. The Effects of *Eimeria acervulina* Infection on the Metabolism of Chick Duodenal Tissue. **Veterinary Parasitology**, v. 14, n. 2, p. 105-115, 1984.
- ALLEN, P. C.; FETTERER, R. H. Interaction of dietary vitamin E with *Eimeria maxima* infection in chickens. **Poultry Science**, v. 81, n. 1, p. 41-48, 2002. ALLEN, P. C.;
- DANFORTH, H. D.; AUGUSTINE, P. C. Dietary modulation of avian coccidiosis. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 7, p. 1131-1140, 1998.
- ALLEN, P. C.; LYDON, J.; DANFORTH, H. D. Effects of components of *Artemisia annua* on coccidia infections in chickens. **Poultry Science**, v. 76, n. 8, p. 1156-1163, 1997.
- ALMQUIST, H. J.; GRAU, C. R. Interrelationship of methionine, choline, betaine and arsenocholine in the chick. **Journal of Nutrition**, v. 27, p. 263-269, 1943.
- ATENCIO, A.; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, SANTIAGO, H. Exigências de metionina mais cistina para frangos de corte machos em diferentes fases de criação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 5, p. 1152-1166, 2004.
- AUGUSTINE, P. C.; DANFORTH, H. D. Influence of Betaine and Salinomycin on Intestinal Absorption of Methionine and Glucose and on the Ultrastructure of Intestinal Cells and Parasite Developmental Stages in Chicks Infected with *Eimeria acervulina*. **Avian Diseases**, v. 43, n. 1, p. 89-97, 1999.
- AUGUSTINE, P. C.; MECNAUGHTON, J. L.; VIRTANEN, E.; ROSI. Effect of betaine of the growth performance of chicks inoculated with mixed cultures of avian *Eimeria* species and on invasion and development of *Eimeria tenella* and *Eimeria acervulina* in vitro and in vivo. **Poultry Science**, v. 76, n. 6, p. 802-809, 1997.
- AUGUSTINE, P.; RUFF, M. D. Changes in Carotenoid and Vitamin A Levels in Young Turkeys Infected with *Eimeria meleagridis* or *Eimeria adenoids*. **Avian Diseases**, v. 27, n. 4, p. 963-971, 1983.
- BANDONI, S. M.; DUSZYNSKI, D.W. A plea for improved presentation of type material for coccidia. **Journal of Parasitology**, v. 74, n. 4, p. 519-523, 1988.
- BARISON, M. B. Aplicações da Proporção Áurea em Desenho Geométrico. **Geométrica**, v. 01, p. 14, 2005.
- BAYLES, D. O.; WILKINSON, B. J. Osmoprotectants and Cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 23-27, 2000.

BEACH, J. R.; CORL, J. C. Studies in the control of avian coccidiosis. **Poultry Science**, v. 4, p. 83-93, 1925.

BECKER, E. R. Dietary control in experimental coccidiosis. **Science**, v. 86, p. 403-404, 1937.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; NETO, A. G. F. **Manual de Técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: EDART, 1976. 256 p.

BELLAVER, C.; JAENESKI, F. R.; COSTA, C. F.; ÁVILA, V. S. **Relatório de projeto de pesquisa sobre a acidificação de dietas para frangos de corte com ácido láctico**. Contrato PURAC/Embrapa Suínos e Aves. Embrapa Suínos e Aves Concórdia, SC, Brasil. 2003.

BELLAVER, C.; SCHEUERMANN, G. Aplicações dos Ácidos Orgânicos na Produção de Aves de Corte. In: III SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE AVES E SUÍNOS, 2004, Florianópolis. Disponível em: <[http://www.cnpsa.embrapa.br/palestras/palestras/3\\_acidos\\_organicos\\_frangos\\_final.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/palestras/palestras/3_acidos_organicos_frangos_final.pdf)>. Acesso em: 10 Dez 2004.

BOCH, J.; NAU-WAGNER, G.; BREMER, S. K. E. Glycine Betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. **Archives in Microbiology**, v. 168, n. 4, p. 282-289, 1997.

BOHNERT, H. J.; NELSON, D. E.; JENSEN, R. G. Adaptation to Environmental Stresses. **Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 1099-1111, 1995.

BORDIN, E. L. Patologia e patogenia da coccidiose das aves. In: II SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COCCIDIOSE AVIÁRIA, 1999, Foz do Iguaçu. Anais do II Simpósio sobre coccidiose aviária. Campinas: FACTA, 1999, p. 5-7.

BRUNO, L. D. G.; MACARI, M. **Ingestão de água: Mecanismos Regulatórios**. In: MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALEZ, E. Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de corte. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002. Cap. 16, p. 201-208.

CARPENTER, J. F.; CROWE, J. H. The mechanism of cryoprotection of proteins by solute. **Cryobiology**, v. 25, n. 3, p. 244-255, 1988.

CASTRO, A. G. M. A evolução das estratégias de controle da coccidiose aviária no Brasil. In: COCCIFORUN: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE COCCIDIOSE E QUALIDADE INTESTINAL, 2000, Campinas. Anais do Cocciforun: Seminário Internacional sobre Coccidiose e Qualidade Intestinal, FACTA, 2000, p. 63-78.

CAYLEY, S.; LEWIS, B. A.; RECORD JR., M. T. Origins of the osmoprotective properties of betaine and proline in *Escherichia coli* K-2. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 5, p. 1586-1595, 1992.

CHAMBERS, S. T.; KUNIN, C. M. Osmoprotective activity for *Escherichia coli* in mammalian renal inner medulla and urine. **Journal of Clinical Investigation**, v. 80, n. 5, p. 1255-1260, 1987.

CHAPMAN, H. D. Evaluation of the efficacy of anticoccidial drugs against *Eimeria* species in the fowl. **Internacional Journal for Parasitology**, v. 28, n. 7, p. 1441-1444, 1998.

COLNAGO, G. L. A coccidiose como doença nutricional. In: II SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COCCIDIOSE AVIÁRIA, 1999, Foz do Iguaçu. Anais do II Simpósio sobre coccidiose aviária. FACTA, 1999. p. 35-44.

COLNAGO, G. L.; JENSEN, L. S.; LONG, P. L. The effect of feeding a semipurified diet to chickens infected with coccidia. **Poultry Science**, v. 63, n. 4, p. 639-46, 1984.

COOP, R. L.; KYRIAZAKIS, I. Nutrition-parasite interaction. **Veterinary Parasitology** v. 84, p. 187-204, 1999.

CORLISS, J. O. An interim utilitarian hierarchical classification and characterization of the protists. **Acta Protozoologica**, v. 33, n. 1, p. 1-51, 1994.

CRAIG, S. A. S. Betaine in human nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition** v. 80, n. 3, p. 539-549, 2004.

CREVIEU-GABRIEL, I.; NACIRI, M. Effet de l'alimentation sur lès coccidioses chez le poulet. **INRA Productions Animales**, v. 14, p. 231-246, 2001.

CRMV-RJ. Resoluções. Disponível em:  
<<http://www.crmvrj.com.br/legisla/texto/res714.htm>> Acesso em: 22 jul. 2005.

CROMWELL, G. Antibiotic for food producing animals in an American perspective. In: SIMPÓSIO SOBRE AS IMPLICAÇÕES SÓCIO-ECONÔMICAS DO USO DE ADITIVOS NA PRODUÇÃO ANIMAL, 1999, Piracicaba. Anais do Simpósio sobre as implicações sócio-econômicas do uso de aditivos na produção animal, Piracicaba, Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, p. 129-142, 1999.

DANFORT, R.; ALLEN, P. C.; LEVANDER, O. A. The effect of high n-3 fatty acids diets on the ultrastructural development of *Eimeria tenella*. **Parasitology Research**, v. 83, n. 5, p. 440-444, 1997.

DAUGSCHIES, A.; IMAROM, S.; BOLLWAHN, W. Differentiation of porcine *Eimeria* spp. by morphologic algorithms. **Veterinary Parasitology**, v. 81, n. 3, p. 201-210, 1999.

DO VALE, M. M.; MENTEN, J. F. M.; MORAIS, S. C. D.; BRAINER, M. M. A. Mixture of formic and propionic acid as additives in broilers feeds. **Scientia Agricola**, v. 61, n. 4, p. 371-375, 2004.

DORAN, D. J. Pancreatic Enzyme Initiating Excystation of *Eimeria acervulina* Sporozoites. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 33, p. 42-43, 1966a.

DORAN, D. J. Location and Time of Penetration Epithelial Cells by *Eimeria acervulina* Sporozoites. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, v. 33, p. 42-43, 1966b.

DUSZYNSKI, D. W.; WILBER, P. G. A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. **Journal of Parasitology**, v. 83, n. 2, p. 333-336, 1997.

ECKERT, J.; BRAUN, R.; SHIRLEY, M. W.; COUDERT, P. **Biotechnology: Guidelines on techniques in coccidiosis research**, COST 89/820, 1995, Luxembourg, Office for Official Publications of the European Communities, 1995, 300p.

ESTEVE-GARCIA, E; MACK, S. The effect of DL-methionine and betaine on growth performance and carcass characteristics in broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 87, p. 85-93, 2000.

FAYER, R. Epidemiology of protozoan infections: the coccidia. **Veterinary Parasitology**, v. 6, n. 1-3, p. 75-103, 1980.

FERNANDO, M. A. **Eimeria: Infections of the intestine**. In: LONG, P. L. Coccidiosis of man and domestic animals. Florida: CRC Press Boca Raton, 1990. Cap. 4, p. 63-75.

FERNANDO, M. A; McCRAW, B. M. Mucosal morphology and cellular renewal in the intestine of chickens following a single infection of *Eimeria acervulina*. **Journal of Parasitology**, v. 59, n. 3, p. 493-501, 1973.

FERREIRA, D. F. **Manual do Sistema Sisvar para Análises Estatísticas**. Lavras: UFLA, 2000. 63p.

FETTERER, R. H.; AUGUSTINE, P. C.; ALLEN, P. C. BARFIELD, R. C. The effect of dietary betaine on intestinal and plasma levels of betaine in uninfected and coccidian-infected broiler chicks. **Parasitology Research**, v. 90, n. 4, p. 343-348, 2003.

FONDACARO, J. D. Intestinal ion transport and diarrheal disease. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 250, n. 1, p. 1-8, 1986.

GOLDFLUS, F. Aplicação de Betaína em Dietas de Frangos de Corte. In: **SEMINÁRIO TÉCNICO FINNFEEDS**, Campinas, 1998, p. 21-26.

GRAAT, E. A. M.; HENKEN, A. M.; PLOEGER, H. W.; NOORDHUTZEN, J. P. T. M.; VERTOMMEN, M. H. Rate and course of sporulation of oocysts of *Eimeria acervulina* under different environmental conditions. **Parasitology**, v. 108, n. 5, p. 497-502, 1994.

HAMMOND, D. M.; LONG, P. L. **The Coccidia: Eimeria, Isospora, Toxoplasma and related Genera**. London: University Park Press, 1973. 482 p.

HOSTE, H. Adaptive physiological processes in the host during gastrointestinal parasitism. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 3, p. 231-244, 2001.

HUNTLEY, H. E. **A Divina Proporção: Um ensaio sobre a beleza na matemática**. Brasília: UnB, 1985. 178p.

JOHNSON, J.; REID, W. M. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. **Experimental Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 30-36, 1970.

JOYNER, L. P.; NORTON, C. C. The anticoccidial effects of amprolium, dinitolmide and monensin against *Eimeria maxima*, *E. brunetti* and *E. acervulina* with particular reference to oocyst sporulation. **Parasitology**, v. 75, n. 2, p. 155-164, 1977.

KAWAZOE, U. **Coccidiose**. In: JUNIOR, A. B.; MACAR I, M. Doenças das aves. Campinas: FACTA, 2000. Cap.7, p. 391-401.

KETTUNEN, H.; PEURANEM, S.; TIIHONEN, K. Betaine aids in the osmoregulation of duodenal epithelium of broiler chicks, and affects the movement of water across the small intestinal epithelium in vitro. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 129, n. 2, p. 759-769, 2001a.

KETTUNEN, H.; TIIHONEN, K.; PEURANEM, S.; SAARINEN, M. T.; REMUS, J. C. Dietary betaine accumulates in the liver and intestinal tissue and stabilizes the intestinal epithelial structure in healthy and coccidia-infected broiler chicks. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 130, n. 4, p. 595-603, 2001b.

KIDD, M. T. FERKET, P. R., GARLICH, J. D. Nutritional and osmoregulatory functions of betaine. **World Poultry Science Journal**, v. 53, n. 2, p. 125-139, 1997.

KLASING, K. C.; ADLER, K. L.; REMUS, J. C.; CALVERT, C. C. Dietary betaine increases intraepithelial Lymphocytes in the duodenum of coccidia-infected chicks and increases functional properties. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 8, p. 2274-2282, 2002.

KLAYMAN, D. L. Qinghaosu (Artemisinin): an antimalarial drug from China. **Science**, v. 228, n. 4703, p. 1049-1055, 1985.

KOVEIT, A. J. Effect on mortality of semipurified diets versus natural feedstuffs fed to chickens infected with *Eimeria tenella*. **Avian Diseases**, v. 13, n. 2, p. 288-296, 1969.

KUCERA, J.; REZNICKY, M. Differentiation of species of *Eimeria* from the fowl using a computerized image analysis system. **Folia Parasitologica**, v. 38, n. 2, p. 107-113, 1991.

LEVINE, N. D. **Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man**. 2<sup>nd</sup> Ed. Minneapolis: Burgess, 1973. 406p.

LEVINE, N. D. **Veterinary Protozoology**. 1<sup>st</sup> Ed. Ames: Iowa State University Press, 1985, 414p.

LONG, P. L.; JOYNER, L. P. Problems in the identification of species of *Eimeria*. **Journal of Protozoology**, v. 31, n. 4, p. 535-541, 1984.

LONG, P. L.; JOYNER, L. P.; MILLARD, B. J.; NORTON, C. C. A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. **Folia Veterinaria Latina**, v. 6, n. 3, p. 201-216, 1976.

LOWRY, K. R.; IZQUIERDO, Q. A.; BAKER, D. H. Efficacy of betaine relative to choline as a methyl donor. **Poultry Science**, v. 55 (Suppl. 1), p. 135, 1987.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 256-275, 1951.

MACARI, M.; MAIORKA, A. Aspectos fisiológicos da qualidade intestinal e produtividade em frangos de corte. In: COCCIFORUN: SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE COCCIDIOSE E QUALIDADE INTESTINAL, 2000, Campinas. Anais do Cocciforun: Seminário Internacional sobre Coccidiose e Qualidade Intestinal, FACTA, 2000, p. 2-32.

MACDOUGALD, L. R.; REID, W. M. **Coccidiosis**. In: CALNECK, B. W. Diseases of Poultry. 10<sup>th</sup> ed. Iowa State University Press: Ames, 1987, p. 465.

MACNEIL, S. D.; NUCCIO, M. L.; HANSON, A. D. Betaine and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering or stress resistance. **Plant Physiology**, v. 120, p. 945-949, 1999.

MAIORKA, A.; BOLELI, I. C.; MACARI, M. **Desenvolvimento e reparo da mucosa intestinal**. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALEZ, E. Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de corte. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002a. Cap. 8, p. 113-123.

MAIORKA, A.; SANTIN, E.; LAURENTIZ, A. C.; ZANELLA, I. Efeito do nível de energia e ácidos orgânicos em dietas iniciais de frangos de corte. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2002, Recife. Anais da XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2002b.

MAIORKA, A.; SANTIN, E.; SUGETA, S. M.; MACARI, M. Utilização de prebióticos, probióticos ou simbióticos em dietas para frangos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 3, n. 1, p. 75-82, 2001.

MATTHEWS, J. O.; SOUTHERN, L. L. The effect of dietary betaine in *Eimeria acervulina*-infected chicks. **Poultry Science**, v. 79, n. 1, p. 60-65, 2000.

MATTHEWS, J. O.; WARD, T. L.; SOUTHERN, L. L. Interactive Effects of Betaine and Monensin in Uninfected and *Eimeria acervulina*-infected Chicks. **Poultry Science**, v. 76, n. 7, p. 1014-1019, 1997.

MCDEVITTI, R. M.; MACK, S.; WALLIS, I. R. Can Betaine partially Replace or Enhance the Effect of Methionine by Improving Broiler Growth and Carcass Characteristics? **British Poultry Science**, v. 41, n. 4, p. 473-480, 2000.

MCNEIL, S. D.; NUCCIO, M. L.; HANSON, A. D. Betaines and Related Osmoprotectants. Targets for Metabolic Engineering of Stress Resistance. **Plant Physiology**, v. 120, p. 945-949, 1999.

MENEZES, R. C. A.; LOPES, C. W. G. Epizootiologia da *Eimeria arloingi* em caprinos na microrregião Serrana Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, série Ciências da Vida**, v. 17, n. 1, p. 5-12, 1995.

MUÑOZ-CLARES, R. A.; VELASCO-GARCIA, R. Gênio Y figura de la betaína aldehído deshidrogenasa. **Mensaje Bioquímico**, vol. 28, p. 203-222, 2004.

NIANG, T. M. S. **Suplementação da Betaína e o Desenvolvimento e Características da Carcaça, Digestibilidade da Ração e o Desenvolvimento do Intestino Delgado de Frangos de Corte Infectados por *Eimeria acervulina***. Dissertação de Mestrado, UFRRJ. Seropédica, RJ, 2005, 78p.

NICULESCU, M. D.; ZEISEL, S. Diet, Methyl Donors and DNA Methylation: Interactions between Dietary Folate, Methionine and Choline. **Journal of Nutrition**, v. 132, n. 8 (suppl.), p. 2333-2335, 2002.

NICULESCU, M. D.; MAR, M.; HOWE, J. C.; HOLDEN, J. M. Concentrations of Choline-Containing Compounds and Betaine in Common Foods. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 9, p. 1302-1307, 2003.

PEREIRA, M. J. S.; FONSECA, A. H.; LOPES, C. W. G. Regressão linear na caracterização de variações morfométricas em coccidia. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 10, n. 2, p.75-78, 2001.

PETRONINI, P. G.; DE ANGELIS, E.; BORGHETTI, A. F.; WHEELER, K. P. Modulation by betaine of cellular responses to osmotic stress. **Biochemistry Journal**, v. 282, n. 1, p. 69-73, 1992.

PINTO, R.; FERREIRA, A. S.; DONZELE, J. L. Exigência de metionina mais cistina para codornas japonesas em crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 5, p. 1174-1181, 2003.

PIVA, G.; ROSSI, D F. Possible alternatives to the use of antibiotics as growth promoters. New additives. International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies (CIHEAM) – *Options Méditerranéennes*. Disponível em: <<http://ressources.ciheam.org/om/pdf/c37/99600009.pdf>>. Acesso em: Fev. 2005.

REID, W. M. Relative Value of Oocysts Counts in Evaluating Anticoccidial Activity. **Avian Diseases**, v. 19, n. 4, p. 803-811, 1975.

REINA, M. Técnicas de Contaje Celular. Disponível em: <<http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/contajecelular.htm>>. Acesso em: Fev. 2005.

REMUS, J.; VIRTANEN, E. Use of liquid betaine in low methionine diets for broilers. **Poultry Science**, v. 75, (suppl.), p. 35. 1996.

REMUS, J. C.; VIRTANEN, E.; ROSI, L.; MACNAUGHTON, J. Effect of betaine on nutrient utilization of 21-day-old broilers during coccidiosis. In: TENTH WORLD'S POULTRY SCIENCE ASSOCIATION. CONFERENCE ON POULTRY NUTRITION Antalya, 1995. Proceedings of the Tenth World's Poultry Science Association, Oxfordshire, 1995. p. 371-372.

RON, K. Fibonacci Numbers and the Golden Section. Disponível <<http://www.mcs.surrey.ac.uk/Personal/R.Knott/Fibonacci/fib.html>>. Acesso em: jul. 2005.

ROSTAGNO, H. S.; SILVA, D. J.; COSTA, P. M. A.; FONSECA, J. B.; SOARES, P. R.; PEREIRA, J. A. A.; SILVA, M. A. **Composição de alimentos e exigências nutricionais de aves e suínos (Tabelas Brasileiras)**, Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 2000, 69p.

RUFF M. D.; ANDERSON, W.I.; REID, W. M. Effect of the anticoccidial arprinocid on production, sporulation, and infectivity of *Eimeria* oocysts. **Journal of Parasitology**, v. 64, n. 2, p. 306-311, 1978.

RUFF M. D.; GARCIA, R.; CHUTE, M. B; TAMAS, T. Effect of amprolium on production, sporulation, and infectivity of *Eimeria* oocysts. **Avian Diseases**, v. 37, n. 4, p. 988-992, 1993.

RUFF, M. D. Epidemiologia da coccidiose aviária. In: II SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COCCIDIOSE AVIÁRIA, Foz do Iguaçu. Anais do II Simpósio sobre coccidiose aviária, Campinas: FACTA, 1999, p. 1-4.

RUFF, M. D.; REID, W. M.; JOHNSON, J. Lowered blood carotenoid levels in chickens infected with coccidia. **Poultry Science**, v. 53, n. 5, p. 1801-1809, 1974.

RUTZ, F. **Digestão e Absorção de Vitaminas e Minerais**. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALEZ, E. **Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002. Cap. 8, p.113-123.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2ª Ed. Belo Horizonte: Fundação de estudo e pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.

SCHUTTE, J. B.; JONG, J.; SMINK, W.; PACK, M. Replacement value of betaine for DL-methionine in male broiler chicks. **Poultry Science**, v. 76, n. 2, p. 321-325, 1997.

SILVA, E. N.; ANDREATTI FILHO, R. L. Probióticos e Prebióticos na Avicultura. In: II SIMPÓSIO DE SANIDADE AVÍCOLA. Anais do II Simpósio de sanidade avícola, Santa Maria: UBA, 2000.

SMITS, C. H. M.; SOTO-SALANOVA, M.; FLORES, Y. A. A.; HUURNE, H. M. Modulación A Través de La Dieta Del Confort Intestinal de Los Pollitos, In:

SODRÉ, U. Matemática Essencial: Alegria da Matemática: propriedades matemáticas: seqüência de Fibonacci. Disponível em: <<http://pessoal.sercomtel.com.br/matematica/alegria/fibonacci/seqfib1.htm>>. Acesso em: 22 jul. 2005.

SOULSBY, E. J. L. **Parasitologia y enfermedades parasitarias de los animales domésticos**. 7º Ed., México: Nueva Editorial Interamericana, 1987. 823p.

STEKOL, J. A.; HSU, P. T.; WEISS, S.; SMITH, P. Labile Methyl Donors and it's Synthesis *de novo* in Relation to Growth in Chicks. **Journal of Biological Chemistry**, v. 203, p. 763-773, 1953.



SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**, 11<sup>o</sup> edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 500p.

TEIXEIRA, M. **Coccidiose em Codornas Japonesas (*Coturnix japonica*): Caracterização da Infecção Natural e Identificação das Espécies do Gênero *Eimeria* Schneider, 1875 (Apicomplexa: Eimeriidae) em um Sistema de Criação para Postura**. Seropédica: UFRRJ, 2003. 50p. Dissertação de Mestrado.

TURK, D. E. Intestinal parasitism and nutrient absorption. **Federation proceedings**, v. 33, n. 1, p. 106-111, 1974.

TURK, D. E. Protozoan parasitic infections of the chick intestine and protein digestion and absorption. **The Journal of Nutrition**, v. 102, n. 9, p. 1217-1221, 1972.

TYZZER, E. E. Coccidiosis of gallinaceous bird. **American Journal of Hygiene**, v. 10, p. 269-382, 1929.

VIRTANEN, E. Piecing together the betaine puzzle. **Feed Mix**, v. 3, p. 12-17, 1995.

VIRTANEN, E.; JUNNILA, M.; SOIVIO, A. Effects of food containing betaine/amino acid additive on the adaptation of young Atlantic salmo salar L. **Aquaculture**, v. 83, n. 1-2, p. 109-122, 1988.

VIRTANEN, E.; REMUS, J.; ROSI, L.; MCNAUGHTON, J.; AUGUSTINE, P. The effect of betaine and salinomycin during coccidiosis in broilers. **Poultry Science**, v. 75, p. 149, 1996.

VIRTANEN, E.; ROSI, L. Effects of betaine on methionine requirements of broilers under various environmental conditions. In: AUSTRALIAN POULTRY SCIENCE SYMPOSIUM. Proceedings of the Australian Poultry Science Symposium, Sidney, Australia, 1996, v. 7, p. 88-98.

WAGGONER, B. History of Anton van Leeuwenhoek (1632-1723). Disponível em: <<http://www.ucmp.berkeley.edu/history/leeuwenhoek.html>>. Acesso em: Dez 2005.

WALDENSTEDT, L.; ELWINGER, K.; THEBO, P.; UGGLA, A. Effect of betaine supplement on broiler performance during an experimental coccidial infection. **Poultry Science**, v. 78, n. 2, 182-9, 1999.

WHITAKER, H. M. A.; MENDES, A. A.; GARCIA, E. A.; ROÇA, R.O.; VAROLLI JR, J. C.; SALDANHA, E. P. B. Efeito da suplementação de metionina sobre o desempenho e a avaliação de carcaças de frangos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2002.

WILLIAMS, R. B. Quantification of the crowding effect during infections with the seven *Eimeria* species of the domestic fowl: it's importance for experimental designs and the production of oocyst stocks. **International Journal of Parasitology**, v. 31, n. 10, p. 1056-1069, 2001.

WILLIS, G. B.; BAKER, D. H. Interaction between dietary protein-amino acid level and parasitic infection: morbidity in amino acid deficient or adequate chicks inoculated with *Eimeria acervulina*. **Journal of Nutrition**, v. 111, n. 7, p. 1157-1163, 1981.

YANCEY, P.H.; CLARK, M.E.; HAND, S.C.; BOWLUS, R.D.; SOMERO, G.N. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. **Science**, v. 217, n. 4566, p. 1214-1422, 1982.

YOUN, H. J; NOH, J. W. Screening of the anticoccidial effects of herb extracts against *Eimeria tenella*. **Veterinary Parasitology**, v. 96, n. 4, p. 257-263, 2001.