

FÁBIO FRANCO TEIXEIRA DE FREITAS

SECRETARIA  
DE  
PÓS-GRADUAÇÃO  
I. B.

“Padronização e processo de invasão/inibição de esporozoítos de *Eimeria acervulina* e *E. tenella* em células primárias de galinha, na presença de lectinas de plantas”.

Apoio:



Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) FÁBIO FRANCO TEIXEIRA DE FREITAS e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação, em Parasitologia, da Universidade Estadual de Campinas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Urara Kawazoe

Co-orientador: Dr. Adilson Leite

Campinas  
2002

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA T/UNICAMP	F884p
V	
TOMBO BL	48945
PROC.	16-887102
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$11,00
DATA	10/05/02
Nº CPD	

CM00167268-1

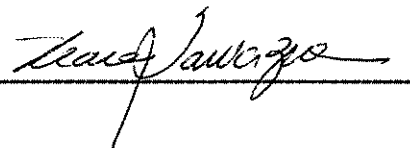
BIB ID 239962

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

**F884p** Freitas, Fábio Franco Teixeira de  
Padronização e processo de invasão/inibição de esporozoítos de *Eimeria acervulina* e *E. tenella* em células primárias de galinha, na presença de lectinas de plantas/Fábio Franco Teixeira de Freitas. --  
Campinas, SP:[s.n.], 2002

Orientadora: Urara Kawazoe  
Co-orientador: Adilson Leite  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia

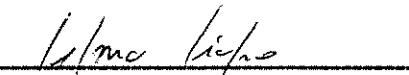
1.Lectinas. 2.Coccidiosis. I. Kawazoe, Urara. II. Leite, Adilson.  
III. Universidade Estadual de Campinas.Instituto de Biologia. III.Título.

**DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO****DATA: 04/03/2002****BANCA EXAMINADORA*****Profa. Dra. Urara Kawazoe (Orientadora)***

---

***Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti***

---

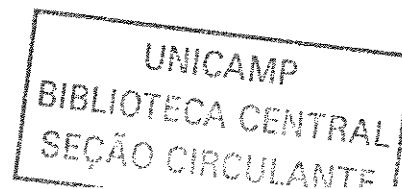
***Profa. Dra. Selma Giorgio***

---

***Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta***

---

Horacio



## **DEDICATÓRIA**

À minha esposa Érica, pelo amor, carinho e dedicação os  
quais me deram força para alcançar meus sonhos.

Aos meus queridos pais que me ensinaram a sonhar.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Urara Kawazoe, pela oportunidade de aprender mais do que as técnicas, mas a ter senso crítico para a pesquisa. Pelo carinho, atenção e amizade dispensados ao aluno e à pessoa.

Ao Dr. Adilson Leite pela colaboração para a realização desse trabalho.

À Profa. Dra. Maria Sílvia Viccari Gatti, pelo treinamento e orientação no trabalho realizado com as culturas celulares. Pela amizade e pelo exemplo que certamente contribuíram para minha formação como pesquisador.

Ao Prof. Dr. Benildo de Souza Cavada, por ter cedido as lectinas de planta, objetos de estudo desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Ivan Joel Schumacher, pela parceria nos experimentos de citometria de fluxo.

Ao doutorando Arnaldo da Silva Júnior, sempre pronto a auxiliar em diversos experimentos e na interpretação de resultados.

A técnica Cirene Alves Manarini Lima, pelo apoio na obtenção dos parasitas e em diversos experimentos.

A técnica Ana Lúcia Rodrigues da Soledade, pelo apoio essencial nas etapas de cultivo celular, pelo carinho, amizade e atenção sempre dispensados.

Aos Docentes do Departamento de Parasitologia que contribuíram para minha formação como parasitologista.

À FAPESP pelo apoio financeiro essencial que permitiu a realização desse projeto de pesquisa.

# ÍNDICE

<b>1. RESUMO</b> .....	1
<b>2. ABSTRACT</b> .....	2
<b>3. INTRODUÇÃO</b> .....	3
3.1. Biologia.....	4
3.2. Medicamentos anticoccidianos.....	8
3.3. Vacinas vivas.....	9
3.4. Vacinas recombinantes.....	11
3.5. Lectinas.....	12
3.5.1. Lectinas de plantas.....	14
<b>4. JUSTIFICATIVA</b> .....	16
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	18
<b>6. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
6.1. Obtenção de oocistos esporulados.....	19
6.2. Purificação de esporozoítos.....	19
6.3. Testes de Invasão/Inibição.....	20
6.3.1. Padronização de Métodos.....	20
6.3.2. Número de células e confluência da monocamada.....	20
6.3.3. Número de esporozoítos.....	21
6.3.4. Cultura de células primárias de rim de galinha.....	24
6.3.5. Cultura de células primárias de embrião de galinha.....	24
6.3.6. Lectinas de plantas.....	25
6.3.7. Efeito do tratamento dos esporozoítos com as lectinas.....	25
6.3.8. Efeito do tratamento das células com as lectinas sobre a invasão dos esporozoítos.....	26
6.3.9. Efeito da D-manose no tratamento dos esporozoítos com DViol....	27
6.4. Teste de Integridade de Membrana.....	28
6.5. Análise Estatística.....	30
<b>7. RESULTADOS</b> .....	31
7.1. Testes de Invasão/Inibição de esporozoítos de <i>Eimeria acervulina</i> tratados	

---

com seis lectinas de planta, às células primárias de rim de galinha.....	31
7.2. Testes de Invasão/Inibição de esporozoítos de <i>Eimeria acervulina</i> tratados com cinco lectinas de planta às células primárias de embrião de galinha.....	36
7.3. Testes de Invasão/ Inibição de esporozoítos de <i>Eimeria acervulina</i> às células primárias de embrião de galinha, pré-incubadas com lectinas.....	38
7.4. Testes de Invasão/ Inibição de esporozoítos de <i>Eimeria tenella</i> tratados com seis lectinas de planta, às células primárias de embrião de galinha.....	40
7.5. Teste de Integridade da Membrana de esporozoítos de <i>Eimeria acervulina</i> tratados com seis lectinas de planta.....	45
7.6. Influência da D-manose no tratamento dos esporozoítos de <i>Eimeria acervulina</i> e <i>E. tenella</i> com DViol.....	46
<b>8. DISCUSSÃO</b> .....	50
<b>9. CONCLUSÕES</b> .....	56
<b>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	58

---

## 1. RESUMO

Os efeitos de seis lectinas da subtribo Diocleinae - DViol, DVir, DGr, ConBr, CF – e da subfamília Mimosoideae – PP – sobre as formas infectantes - esporozoítos de *Eimeria acervulina* e *E. tenella*, foram examinadas para determinar o índice de invasão em células primárias de rim e de embrião de galinha. O pré-tratamento de esporozoítos com 100µg/ml das seis lectinas e com 50µg/ml de DViol, DVir, ConBr e PP inibiram significativamente a invasão por *E. acervulina* e *E. tenella*, respectivamente. O pré-tratamento das células primárias de embrião de galinha com seis lectinas (100µg/ml) não apresentou efeito estatisticamente significativo sobre a invasão dos esporozoítos de *E. acervulina*. Não houve correlação entre a afinidade da lectina DViol por D-manose (açúcar de especificidade das lectinas) e o efeito de inibição da invasão, uma vez que o tratamento de esporozoítos de *E. acervulina* e *E. tenella* com essa lectina e D-manose apresentou resultado semelhante ao tratamento somente com lectina. A análise dos esporozoítos de *E. acervulina* tratados com as seis lectinas (100µg/ml), por meio de citometria de fluxo, não demonstrou ruptura na membrana nem perda da viabilidade desses esporozoítos. Os dados obtidos no presente trabalho sugerem que interações específicas entre as lectinas Diocleinae e esporozoítos de *E. acervulina* e *E. tenella* podem alterar o processo de invasão às células cultivadas *in vitro* sem, no entanto, apresentar atividade parasiticida.

---



## 2. ABSTRACT

The effect of six plant lectins in the invasion of *Eimeria acervulina* and *E. tenella* sporozoites using primary chick kidney and embryo cells cultivated *in vitro*, was examined. Pretreatment of sporozoites with 100µg/ml of DViol, DVir, DGr, ConBr, CF, PP and 50µg/ml of DViol, DVir, ConBr and PP inhibited significantly the invasion of *E. acervulina* and *E. tenella* sporozoites, respectively. Pretreatment of cell cultures with 100µg/ml of lectins had no significant effect on *E. acervulina* sporozoites invasion. There was no correlation between sugar affinity of lectins for D-manose and the inhibitory effect of the parasites demonstrated by treatment of *E. acervulina* and *E. tenella* sporozoites with DViol and incubated with or without D-manose which showed similar inhibitory effects. Flow citometric analysis of *E. acervulina* sporozoites treated with 100µg/ml of six lectins showed no membrane disruption and loss of viability. The data observed in the present study suggest that specific interactions between Diocleinae lectins and *E. acervulina* and *E. tenella* sporozoites can change the process of invasion in cells cultivated *in vitro* without showing parasiticide activity. The experiments carried out showed higher effect of lectins on *E. acervulina* sporozoites than for *E. tenella* sporozoites.

---

### 3. INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado atualmente, o terceiro maior produtor de frango de corte do mundo, possuindo em 1998 cerca de 25 milhões de cabeças de matrizes de corte e cerca de três bilhões de cabeças de pinto de corte. A produção nacional de carne de frango em 1998 foi de cerca de 4,5 milhões de toneladas. Com esse volume de produção, o Brasil também se situa como o segundo exportador mundial, tendo exportado em 1998 um total aproximado de 600 milhões de Kg entre carne de frango inteiro e em pedaços, o que representou cerca de 750 milhões de dólares. O desempenho do Brasil no setor da avicultura seria ainda maior se não fossem as doenças que afetam o plantel brasileiro, como por exemplo a coccidiose, uma das principais causas de perda econômica (FACTA, 2001).

A coccidiose é uma das doenças parasitárias mais importantes e antigas em aves domésticas, apresentando formas severas de enteropatia. Atualmente, é considerado um dos principais problemas na indústria avícola mundial. Embora existam diversos produtos anticoccidianos em uso comercial para o controle dessa enfermidade, os problemas atuais relacionados com o controle da doença têm sido maiores que no passado devido a inúmeros fatores, entre eles, a resistência dos parasitas aos medicamentos anticoccidianos e o uso indevido dessas drogas e das vacinas vivas virulentas.

Estima-se que, o custo das formas clínica e sub-clínica da coccidiose em todo o mundo esteja em torno de 500 milhões de dólares anuais. CASTRO (1992, *apud* CASTRO, 1994) mostrou que a diminuição de 100g no peso vivo e o gasto adicional de 100g de ração para cada Kg de frango produzido em função da coccidiose, eleva o custo de produção em 8%. Supondo que 10% do plantel brasileiro tivesse sido afetado por coccidiose em 1991, o prejuízo anual representaria 13 milhões de dólares. Por outro lado, JORGE NETO (*apud*

---

CASTRO, 1994) demonstrou que o custo do frango teria uma perda de US\$30 milhões por ano caso 10% do plantel brasileiro fosse afetado com a coccidiose.

### 3.1. Biologia

A coccidiose é causada por protozoários de gênero *Eimeria*, pertencentes ao Filo Apicomplexa, compreendendo protozoários parasitas que possuem um complexo apical, isto é, um conjunto de organelas localizadas na porção anterior das formas infectantes do parasita, as quais estão envolvidas na adesão e na penetração dessas formas nas células hospedeiras. Esse complexo é formado pelas seguintes organelas: dois **anéis polares** elétron-densos; um **conóide** formado por diversos microtúbulos em espiral dentro do anel polar; **roptrias** tubulares ou saculares; **micronemas**; **grânulos densos** e **microtúbulos subpeliculares** que se estendem ao longo do anel polar (CURRENT *et al.*, 1990). Recentemente, uma organela denominada **apicoplasto** foi descrita em organismos do Filo Apicomplexa (KÖHLER *et al.*, 1997).

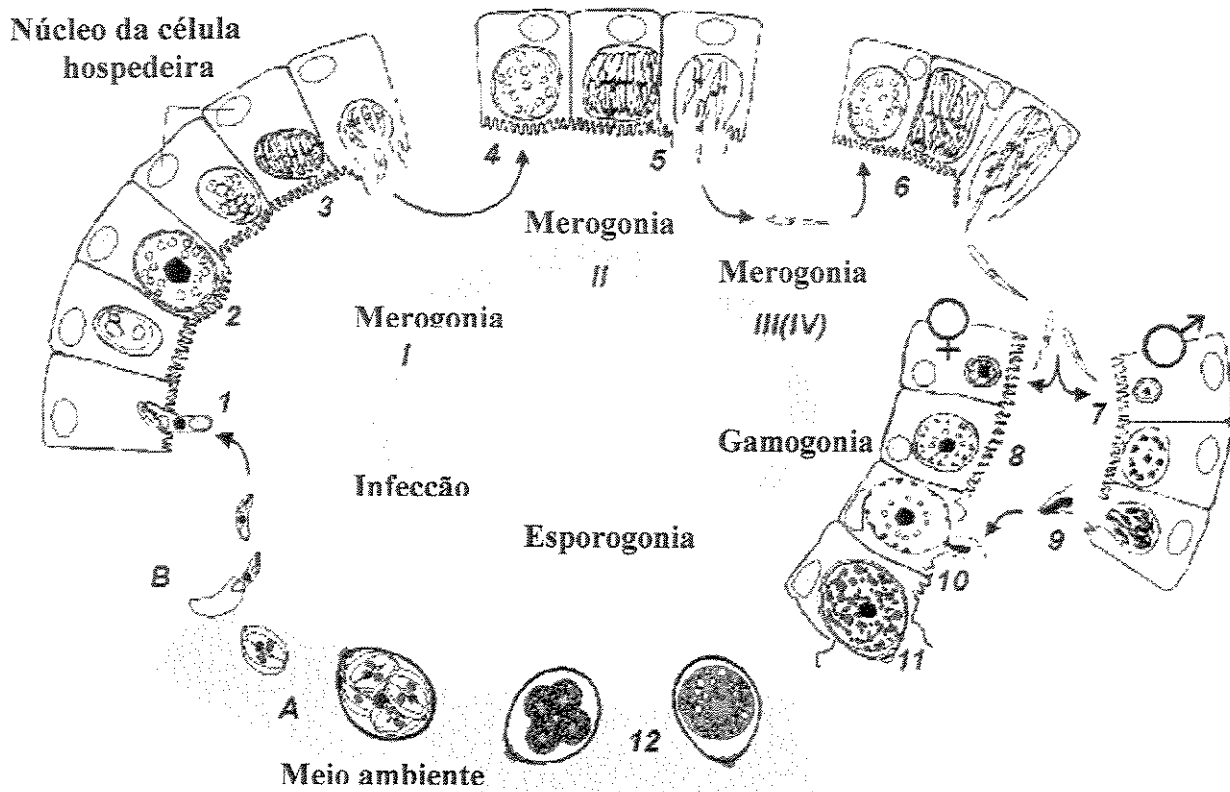
O ciclo de vida das espécies de *Eimeria* possui três fases distintas: esporogonia que ocorre no meio exterior, merogonia e gametogonia que ocorrem dentro das células do tubo digestivo das aves domésticas, sendo necessário o desenvolvimento completo das três fases para haver a formação final dos oocistos (forma de resistência). A contaminação ocorre quando as aves ingerem oocistos esporulados, contendo no seu interior quatro esporocistos com dois esporozoítos cada. Através de estímulos como temperatura e CO<sub>2</sub>, e pela ação mecânica da moela, a membrana do oocisto se rompe liberando os esporocistos no duodeno. A tripsina no trato intestinal digere uma estrutura chamada corpo de Stieda na parede dos esporocistos e os sais biliares estimulam a motilidade dos esporozoítos,

---

promovendo a sua excitação (CURRENT *et al.*, 1990). Os esporozoítos penetram nas células da vilosidade intestinal, iniciando o processo infeccioso. Primeiramente ocorre o ciclo assexuado, com a formação de merozoítos por um processo de merogonia e, a seguir, desenvolve-se a fase assexuada com a formação dos gametas masculinos e femininos (KAWAZOE, 1994). A fusão dessas formas origina o zigoto que elabora uma membrana cística ao seu redor dando origem ao oocisto. Essas formas são eliminadas com as fezes para o meio exterior. Os oocistos que não completam a esporulação são inofensivos enquanto os oocistos esporulados são infectantes e podem sobreviver no ambiente por um período aproximado de 3 a 6 meses. Este fato pode permitir o transporte e a transmissão dessas formas para as aves por meio de pessoas, animais domésticos, insetos, pássaros, etc. O esquema do ciclo de vida de *Eimeria* spp. encontra-se na **Figura 1**.

Atualmente, são consideradas válidas sete espécies de *Eimeria* que infectam as galinhas: *Eimeria acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* e *E. tenella*. As principais características dessas espécies estão descritas no **Quadro 1**. As espécies de *Eimeria* que parasitam galinha doméstica são espécie - específicas desse hospedeiro. Essa especificidade refere-se também, ao seu habitat no nível intestinal e à sua localização dentro das células epiteliais. Aquelas de localização mais superficial causam menos dano ao hospedeiro (*E. praecox*, *E. mitis*) enquanto aquelas de localização mais profunda ocasionam casos mais severos da doença (*E. tenella* e *E. necatrix*) (SHIRLEY, 1989).

---



**FIGURA 1.** Ciclo de vida de *Eimeria* spp. em galinhas (WECK-HEIMANN, 2001).

1. Após ingestão oral de oocistos esporulados, os esporozoítos são liberados dos esporocistos na luz do intestino delgado, 2 - 6. os quais penetram nas células epiteliais, transformam-se em trofozoítos uninucleados e iniciam uma multiplicação assexuada por merogonia com a formação dos merozoítos (merontes) dentro do vacúolo parasitóforo. Os merozoítos são liberados dos merontes e iniciam outra geração de merontes em outras células intestinais. 7 - 8. Após duas ou mais gerações assexuadas, os merozoítos, após a penetração nas células epiteliais desenvolvem as formas sexuadas, diferenciando-se em gametas masculinos e femininos pelo processo de gametogonia. Formação de microgamontes multinucleados (7), que dão origem a microgametas flagelados (9). Formação dos macrogamontes uninucleados (7), que após a maturação transformam-se em macrogametas (8), caracterizados pela presença de dois tipos de corpos formadores de parede. 10-11. Após a fertilização dos gametas masculinos e femininos, formam-se os zigotos que elaboram uma parede cística pela fusão de corpos formadores de parede, dando origem aos oocistos. 12. Oocistos não esporulados são liberados com as fezes. A esporulação que ocorre no meio exterior por um processo de esporogonia, é dependente de temperatura e O<sub>2</sub> e leva à formação de quatro esporocistos, cada um contendo dois esporozoítos (A).

**QUADRO 1.** Características das sete espécies de *Eimeria* spp. que ocorrem em galinha doméstica (LONG, 1987).

	Localização	Lesões macroscópicas	Estágios associados à infecção	Patogenicidade *	Imunogenicidade *
<i>E. acervulina</i>	Intestino delgado: porção superior	Infecção leve: estrias transversais esbranquiçadas; infecção maciça: placas coalescentes, espessamento da parede intestinal	Gametócitos, oocistos	++	++
<i>E. brunetti</i>	Intestino delgado: porção inferior e cecos	Coagulação, necrose, enterite sanguinolenta na porção inferior do intestino	Gametócitos, oocistos	+++	++++
<i>E. maxima</i>	Intestino delgado médio	Paredes espessadas, exsudato mucosanguinolento, petéquias	Gametócitos, oocistos	+++	++++
<i>E. mitis</i>	Intestino delgado: porção inferior e cecos	Sem lesões no intestino, exsudato mucóide	Gametócitos, oocistos	++	++
<i>E. necatrix</i>	Intestino médio (ciclo assexual) cecos (ciclo sexual)	Lesões globosas, pontos brancos (esquizontes), petéquias, exsudato com muco e filetes de sangue	Esquizontes	++++	++++
<i>E. praecox</i>	Intestino delgado: porção superior	Sem lesões, exsudato mucóide	Gametócitos, oocistos	(+)	++
<i>E. tenella</i>	Cecos	Início: hemorragia na luz dos cecos; Posterior: mucosa espessada, tecido necrótico do sangue coagulado em forma de charuto	Esquizontes	++++	++++

\* + = Graus de patogenicidade e imunogenicidade segundo o autor.

### 3.2. Medicamentos anticoccidianos

A expansão de produção avícola mundial nos últimos anos levou também ao aumento da coccidiose. As perdas econômicas em decorrência dessa doença levaram ao desenvolvimento de diversos medicamentos anticoccidianos. O uso contínuo desses medicamentos tem levado ao surgimento de resistência dos coccídeos, em graus variados, descrito pela primeira vez por HORTON SMITH (1951).

As drogas anticoccidianas podem ser divididas em dois tipos: compostos químicos sintéticos (amprólio, arprinocide, clopidol, decoquinato, diclazuril, halofuginona, nicarbazina, robenidina e zoalene) e os compostos ionóforos, produzidos através da fermentação de uma variedade de organismos (DANFORTH, 1999). A maioria das drogas desenvolvidas inibe os estágios sexuado ou assexuado de primeira ou segunda gerações do parasita (CHAPMAN, 1993). Os antibióticos ionóforos (monensina, salinomicina, narasina, lasalocida, maduramicina e semduramicina) são mais utilizados atualmente no controle da coccidiose e são capazes de transportar cátions através de membranas biológicas e afetar uma diversidade de processos celulares dependentes do transporte de íons. Essas drogas acumulam-se nos esporozoítos antes que estes penetrem nas células hospedeiras. Porém, a destruição do parasita pode ocorrer antes ou depois da penetração. A concentração da monensina em merozoítos de cepas resistentes foi demonstrada como sendo maior do que a presente em esporozoítos sensíveis (AUGUSTINE *et al.*, 1987). A quantidade de drogas necessária para inibir uma cepa resistente de esporozoítos é em torno de 40 vezes maior do que a necessária para inibir as cepas sensíveis. Desse modo, a diferença na acumulação dos ionóforos no interior do parasita parece ser responsável pelo desencadeamento de

---

resistência, mas os mecanismos pelos quais ocorre a resistência ainda permanecem desconhecidos.

Vários trabalhos têm sido realizados no intuito de caracterizar as drogas disponíveis no mercado, tanto em termos de toxicidade como no desenvolvimento e avaliação da resistência: RILEY & WILSON, 1976; CHAPMAN, 1989; CHAPMAN & SHIRLEY, 1989; KAWAZOE *et al.*, 1991; CHAPMAN, 1993; CHAPMAN, 1994; KAWAZOE & DI FABIO, 1994; CHAPMAN & CHERRY, 1997; CHAPMAN *et al.*, 1998; FRIEDMAN *et al.*, 1998, WILLIAMS, 1998.

### **3.3. Vacinas vivas**

Dada a falta de eficiência completa dos anticoccidianos e o desinteresse das indústrias farmacêuticas em desenvolver novas drogas devido ao alto custo para sua pesquisa e o aparecimento precoce de resistência nesses medicamentos têm-se buscado outras alternativas para o controle da coccidiose. Entre essas alternativas estão as vacinas vivas.

Existem dois tipos de vacinas vivas utilizadas atualmente na indústria avícola: as que contêm oocistos de linhagens selvagens (vacinas virulentas) e as que contêm oocistos de linhagens precoces (vacinas atenuadas). Estas últimas contêm oocistos precoces obtidos através de passagens sucessivas desses parasitas em aves. A margem de segurança das vacinas atenuadas tem sido maior do que das vacinas virulentas, em relação ao aparecimento de um quadro clínico agudo da doença, pelo fato do seu ciclo de desenvolvimento ser mais curto do que o ciclo das espécies parentais correspondentes de

---



*Eimeria* spp. (SHIRLEY, 1994). As vacinas atenuadas têm como vantagens principais a produção de número menor de parasitas no estágio assexuado, menor dano na mucosa intestinal e menor número de oocistos disseminados na cama durante cada ciclo de infecção, além de conferir imunidade protetora nas aves (SHIRLEY, 1999).

A primeira vacina viva tornou-se comercialmente disponível em 1952, nos Estados Unidos, com o nome comercial de Coccivac®. Entretanto, durante os últimos 40 anos o uso de vacinas vivas para o controle da coccidiose tem ocorrido em uma escala relativamente pequena quando comparada ao uso dos anticoccidianos profiláticos. Embora durante esse período tenha ocorrido o aparecimento de uma sucessão de novas drogas anticoccidianas (ionóforos e produtos químicos sintéticos), apenas quatro tipos de vacinas têm sido introduzidos no mercado: Coccivac® (Shering Laboratories Inc., subsidiária da Pitman-Moore Ltd.); Immunocox® ( Vetech Laboratories Inc., Canadá); Paracox® (Pitman-Moore Europa Ltd.) e Livacox® (Biopharm, Research Institute of Biopharmacy and Veterinary Drugs, Praga, República Tcheca). No Brasil foram introduzidos quatro tipos de vacinas: Immunocox® (1991), Coccivac-D® (1994), Livacox®(1997) e mais recentemente Coccivac-B® (1999).

Apesar do custo mais elevado das vacinas vivas em relação aos anticoccidianos, essas vacinas têm sido usadas mais freqüentemente em aves reprodutoras e gradualmente, vem sendo empregadas em frangos de corte. Diversos estudos foram realizados com o intuito de desenvolver cepas precoces de espécies de *Eimeria* spp., como *E. acervulina* (McDONALD *et al.*, 1982), *E. mitis* (McDONALD & BALLINGALL, 1983), *E. praecox* (SHIRLEY *et al.*, 1984), *E. maxima* (McDONALD *et al.*, 1986; SHIRLEY & BELLATTI, 1988), *E. brunetti* (SHIRLEY *et al.*, 1986), *E. tenella* e *E. necatrix* (McDONALD &

---

SHIRLEY, 1987). Além dessas, MONTES *et al.*(1998) selecionaram e desenvolveram uma cepa espanhola de *E. necatrix*. No Brasil KAWAZOE & MANARINI (2001) tiveram êxito em obter uma cepa precoce comprovadamente atenuada de *E. acervulina*.

### 3.4. Vacinas recombinantes

As vacinas recombinantes são constituídas de antígenos extraídos de parasitas obtidos através do uso de técnicas da Biologia Molecular. Muitos trabalhos têm sido realizados caracterizando antígenos de diversas fases do ciclo de vida do parasita: antígenos de oocistos esporulados e não esporulados e esporozoítos de *E. tenella* (GURNETT *et al.*, 1990); perfis antigênicos de organelas dos esporozoítos (KAWAZOE *et al.*,1992); antígenos comuns entre esporozoítos e merozoítos (DANFORTH & McANDREW, 1987; CASTLE *et al.*, 1991); antígenos de gametócitos, principalmente *E. maxima* (MENCHER *et al.*, 1989; WALLACH *et al.*, 1992).

Para que uma vacina recombinante comercial possa ser eficiente, a proteção oferecida deve ser suficientemente alta para permitir a criação de aves sem o uso de anticoccidianos, sem necessariamente erradicar o parasita. Como a imunidade considerada mais importante no caso da coccidiose aviária é representada pela imunidade celular, as vacinas recombinantes devem ser administradas de tal forma que seja estimulada a apresentação dos antígenos aos linfócitos T. JENKINS *et al.* (1991), demonstraram proteção significativa contra perda de peso, bem como graus reduzidos de lesão, em aves imunizadas oralmente com *Escherichia coli* expressando um antígeno recombinante do merozoíto (MZ250) fundido com proteína ligante de galactose (GDP). Além de bactérias, podem também ser utilizados vírus como o da boubá aviária (FPV) e o herpesvírus dos

---

perus como vetores. Outras formas de vacinas recombinantes são as vacinas de DNA. Estas são injetadas ou inoculadas na musculatura da ave e o DNA inserido é transcrito em proteínas antigênicas do parasita, que são expressas e apresentadas no MHC (“major histocompatibility complex”) desencadeando imunidade.

Os ensaios, *in vitro*, sobre inibição de invasão pelas formas parasitárias têm demonstrado o envolvimento de diversas proteínas nos processos de aderência e invasão. Esses resultados também devem ser levados em consideração sugerindo a elaboração de vacinas de composição multiantigênica. Com a evolução do conhecimento sobre as moléculas antigênicas envolvidas no desencadeamento da resposta imune à coccidiose aviária e a padronização de vias adequadas de administração, as vacinas recombinantes podem se tornar ferramentas acessíveis ao mercado avícola no futuro, podendo competir com os medicamentos anticoccidianos e as vacinas convencionais (GRUBER, 1999).

Atualmente têm sido obtidas moléculas peptídicas a partir das formas invasivas de *Eimeria* spp. que possuem efeito lítico sobre as mesmas, podendo ter um futuro promissor como “vacinas moleculares”. Entre essas moléculas, podem ser citados os peptídeos isolados por MARTIN *et al.*(1999) e por SILVA Jr. *et al.*(2001), este último isolado através de bibliotecas de “Phage Display”.

### **3.5. Lectinas**

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas que se ligam de maneira reversível a mono- ou oligossacarídeos específicos (também a glicoproteínas) sem alterar a estrutura dos ligantes. Diversas referências sugerem que as lectinas desempenham papel nas interações entre hospedeiro e protozoários parasitas intestinais, assim como diversas

---

espécies não intestinais. Sua importância como mediadores da aderência é aceita. Já foram encontradas lectinas associadas a *Entamoeba histolytica* (KOBILER & MIRELMAN, 1980; RAVDIN *et al.*, 1985) inclusive associadas com virulência (OROZOCO *et al.*, 1986; PETRI *et al.*, 1986; SALATA *et al.*, 1987); *Giardia lamblia* (FARTHING *et al.*, 1986; LEV *et al.*, 1986, WARD *et al.*, 1987); membros do filo Apicomplexa, como *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum* e *Cryptosporidium parvum* (CRANE & DVORAK, 1982; JUNGERY *et al.*, 1983; GUPTA *et al.*, 1985; THEA *et al.*, 1992).

Outros trabalhos têm sido publicados descrevendo o papel das lectinas nos processos de adesão em infecções por *Eimeria* spp. (AUGUSTINE, 1985; STROUT *et al.*, 1994; BABA *et al.*, 1996). ALROY *et al.* (1989) e SUPRASERT & FUJIOKA (1988) observaram diferenças acentuadas na distribuição de resíduos de carboidratos na superfície luminal das regiões do intestino delgado, grosso e cecos de galinhas. STROUT *et al.* (1994) descreveram a presença de lectinas de superfície, quase exclusivamente em esporozoítos, mas não em merozoítos e oocistos esporulados. Observaram que os tipos de lectinas presentes na composição bioquímica dos esporozoítos de *E. tenella*, *E. acervulina* e *E. maxima* possuíam especificidade para diferentes carboidratos. Dessa forma, sugeriram que as lectinas seriam fatores importantes na localização específica das diferentes espécies de *Eimeria* no trato digestivo das aves. BABA *et al.* (1996), estudaram as lectinas de pêsego na invasão de esporozoítos de *E. tenella* em cultura de células de rim de galinha. Foi sugerido que resíduos de D-galactose na superfície dos esporozoítos, e receptores semelhantes de lectinas nas células hospedeiras, específicos para esse carboidrato, seriam importantes para o processo de invasão. Além disso, demonstraram a propriedade dessas lectinas em inibir a invasão dos esporozoítos.

---

### 3.5.1. Lectinas de Plantas

Define-se lectinas de plantas como: “todas as proteínas de plantas possuindo ao menos um domínio não-catalítico, que se ligue reversivelmente a um mono - ou oligossacarídeo específico” (PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

Diversos tipos de lectinas de plantas têm sido descritos. De acordo com sua estrutura total podem ser divididas em **Merolectinas**, consistindo em um único domínio ligante a carboidrato; **Hololectinas**, contendo pelo menos dois domínios ligantes a carboidrato idênticos ou bastante similares (esses domínios conferem a capacidade de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados); **Superlectinas**, compostos também de pelo menos dois ligantes a carboidratos não idênticos ou similares e apresentando especificidade para açúcares estruturalmente diferentes; **Quimerolectinas**, compostas de um domínio ligante a carboidrato arranjado *in tandem* com um domínio não relacionado, este último possuindo uma atividade biológica independente, bem definida (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

As lectinas como proteínas bioativas (indução de mitose, indução da síntese de proteínas específicas ou processos celulares) podem ser utilizadas em pesquisas que envolvem ativação de linfócitos pelas chamadas lectinas mitogênicas e a indução da síntese de proteínas específicas como enzimas, citocinas ou interleucinas (KILPATRICK, 1991), efeitos indiretos resultando na imobilização de bactérias (BROEKAERT & PEUMANS, 1986) e redução do crescimento bacteriano no intestino (PUTSZTAI *et al.*, 1993). A propriedade das lectinas em se ligar em carboidratos que não estejam presentes em tecidos vegetais, e os efeitos biológicos que desencadeiam nas células, tem apontado essas

---

glicoproteínas como interessantes ferramentas na pesquisa biomédica, podendo ser utilizadas na detecção e caracterização de glicanos específicos ou no isolamento de glicoconjugados. Os recentes progressos na pesquisa dessas lectinas, especialmente quanto ao entendimento das relações entre estrutura / especificidade / função de certos grupos, certamente irão refinar e estender essas aplicações (PEUMANS & VAN DAMME, 1998).

O presente trabalho se propõe a estudar o efeito de **hololectinas** isoladas sementes de leguminosas obtidas nos estados do Ceará e Rio Grande do Sul, da subtribo Diocleinae : DGr, DViol e DVir isoladas de *Dioclea grandiflora*, *D. violacea* e *D. virgata*, respectivamente; CF isolada de *Cratylia floribunda*; e da subfamília Mimosoideae: PP isolada de *Parkia platycephala*. Todas essas lectinas são proteínas com afinidade conservada por glicose/manose e foram isoladas pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Benildo de Souza Cavada da Universidade Estadual do Ceará (DAM *et al.*, 1998; MANN *et al.*, 2001).

---

## 4. JUSTIFICATIVA

A indústria avícola mundial está lutando para desenvolver métodos alternativos no controle a coccidiose. Com o aumento do número de isolados de *Eimeria* spp. encontrados no campo, resistentes aos medicamentos anticoccidianos e o longo caminho até a produção em larga escala de vacinas a preços viáveis, essa busca se torna ainda mais urgente.

Dessa maneira, a contribuição científica na busca de outras alternativas que possam inibir a invasão das formas infectantes desse protozoário e o desenvolvimento do seu ciclo dentro do hospedeiro sem prejudicar o desenvolvimento do animal, torna-se cada vez mais desejável.

As lectinas, devido a suas propriedades biológicas - de ligação a carboidratos específicos e de desencadeadoras de processos celulares, tem amplas possibilidades, tanto no estudo de sua utilização como inibidores bem como ferramentas para elucidar os processos de adesão, envolvidos na relação parasito - hospedeiro (PEUMANS & VAN DAMME, 1998). Vários trabalhos têm sido realizados correlacionando a ação das lectinas com os processos de adesão celular em diversos protozoários parasitas, inclusive determinando os sítios de infecção, no caso das espécies de *Eimeria* (STROUT *et al.*, 1994). No processo de adesão dos esporozoítos às células primárias de galinha estão envolvidos mecanismos específicos não elucidados. Através do tratamento dos esporozoítos e das células com as lectinas Diocleinae – DVir, DViol, DGr, ConBr, CF e PP, das quais são conhecidas diversas propriedades inclusive a especificidade dessas moléculas, pretende-se averiguar os possíveis mecanismos envolvidos na ação dessas lectinas sobre o processo de invasão celular. Alterações nas taxas de invasão celular após o tratamento,

---

podem indicar modificações das moléculas da membrana do esporozoíto ou da célula hospedeira.

LILLEY *et al.* (1999) sugeriram o papel das lectinas de plantas como “vacinas comestíveis” desenvolvidas em plantas transgênicas: à medida que os animais se alimentassem dessas plantas estariam se imunizando contra seus parasitas. Para que isso seja possível, muitos estudos ainda são necessários para analisar as propriedades das lectinas de plantas e seus possíveis efeitos em animais.

Desta forma, como o uso de vacinas vivas virulentas não apresenta segurança total a uma possível infecção com manifestações clínicas decorrentes da própria vacina e as vacinas atenuadas ainda apresentam um custo alto para a sua produção, justifica-se o estudo de tratamentos alternativos não residuais para controlar a coccidiose nas granjas comerciais.

Estudos já estão sendo realizados pelo grupo de pesquisa do Dr. Adilson Leite do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da UNICAMP, co-orientador do projeto, no sentido de expressar as lectinas avaliadas no presente trabalho em milho, que representa em torno de 80% da ração utilizada para a criação de frangos. Diante desse fato, a possibilidade de atuação dessas lectinas sobre os parasitas de *Eimeria* spp. se torna ainda mais interessante uma vez que elas poderiam relamente funcionar como “vacinas comestíveis”.

---



## 5. OBJETIVOS

O objetivo do presente projeto foi avaliar as propriedades de seis lectinas: DVir, DViol, DGr, ConBr, CF e PP isoladas de leguminosas Diocleinae quanto a sua ação no processo de invasão de esporozoítos nas duas principais espécies de *Eimeria* spp. causadoras de perdas econômicas: *E. acervulina* e *E. tenella*. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Capacidade das lectinas de inibir a invasão dos esporozoítos de *Eimeria acervulina* às células primárias de rim de galinha, observando-se os efeitos do tratamento dos esporozoítos e das células.
  - Capacidade das lectinas de inibir a invasão dos esporozoítos de *Eimeria tenella* às células primárias de embrião de galinha, observando-se os efeitos do tratamento dos esporozoítos.
  - Influência da especificidade da lectina DViol pela D-manose sobre o efeito inibitório.
  - Relação entre o efeito das lectinas sobre a integridade da membrana dos esporozoítos de *Eimeria acervulina* e o efeito inibitório.
  - Comparação dos efeitos das lectinas sobre os esporozoítos de *Eimeria acervulina* e *E. tenella*.
-

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1. Obtenção de oocistos esporulados

Exemplares machos de galinhas das linhagens “Hy-line”- 36 e “White Leghorn”, com 28 a 35 dias de idade, criados em salas livres de patógenos no Departamento de Parasitologia / IB / UNICAMP foram utilizados para a inoculação de 5 a  $10 \times 10^4$  oocistos esporulados de *Eimeria acervulina* e *E. tenella* para a obtenção de oocistos.

Os oocistos foram purificados através do método de flutuação em solução saturada de NaCl. A esporulação foi realizada em solução de dicromato de potássio a 2% na presença de O<sub>2</sub>, a temperatura ambiente aproximada de 28°C (LONG *et al.*, 1976; CHAPMAN, 1978).

### 6.2. Purificação de esporozoítos

Os oocistos esporulados foram rompidos mecanicamente, por agitação com pérolas de vidro, para a liberação dos esporocistos. Os esporocistos foram incubados a 41°C na presença de tripsina e sais biliares para estimular a excitação de esporozoítos (LONG *et al.*, 1976; CHAPMAN, 1978). Os esporozoítos foram purificados através do uso de cromatografia de troca aniônica em coluna de celulose DAE-52 (SHMATZ *et al.*, 1984).

---

### **6.3. Testes de Invasão /Inibição**

#### **6.3.1. Padronização de Métodos**

Inicialmente, foram realizadas padronizações do número de esporozoítos e de células a serem utilizadas nos testes de invasão/inibição. Dois tipos celulares foram avaliados: para os testes com *E. acervulina* foram utilizadas células primárias de rim e de embrião de galinha e para *E. tenella* células primárias de embrião de galinha.

A diferença entre essas culturas celulares é a concentração de fibroblastos: mais de 25% no cultivo de material de rim e em torno de 90% para o material de embrião. O segundo tipo celular foi adotado como definitivo devido a maior uniformidade de tipo celular apresentado e pela facilidade de obtenção dessas culturas fornecidas pela FORT DODGE, diminuindo significativamente o risco da contaminação e o custo da pesquisa. Para ambas as culturas, os seguintes itens foram padronizados:

- Número de células a ser utilizado por “well”;
- Confluência da monocamada de células utilizadas;
- Número de esporozoítos por “well”, a ser utilizado nas infecções.

#### **6.3.2. Número de células e confluência da monocamada**

Foram testadas concentrações de  $2,5 \times 10^5$  células/ “well” e  $5 \times 10^5$  células/ “well” com confluências de 80 e 100% para as culturas de células primárias de rim de galinha. Na tentativa de aumentar a concentração de células viáveis e obter uma confluência menor da monocamada final, foram realizados testes lavando-se o excesso de células mortas 30 a 40 minutos após a confecção das placas para ambas as concentrações.

---

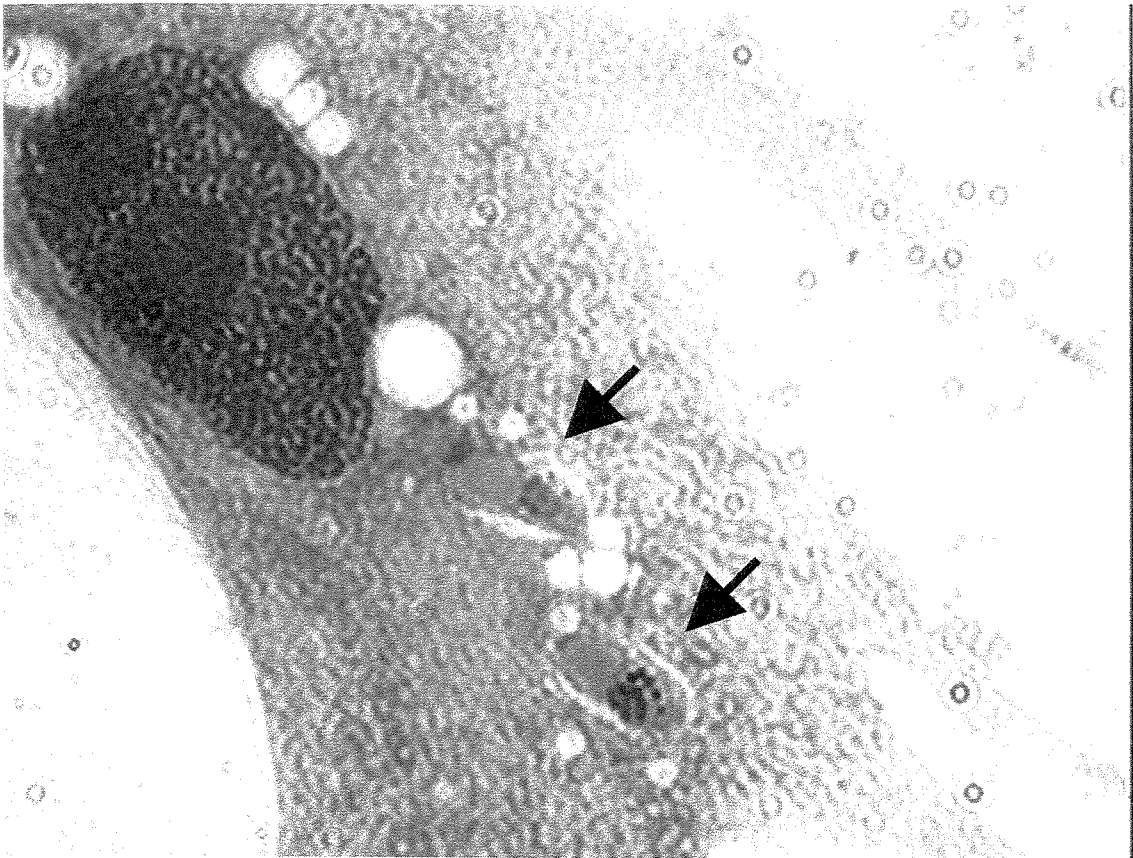
Para as culturas de células primárias de embrião de galinha foram testadas as concentrações de  $1 \times 10^5$  células/ “well”,  $2 \times 10^5$  células/ “well”,  $2,5 \times 10^5$  células/ “well” e  $5 \times 10^5$  células/ “well”. Somente a concentração de  $2 \times 10^5$  células/ “well” apresentou confluência adequada de 80 a 100% mantendo a característica de monocamada.

### **6.3.3. Número de esporozoítos**

As concentrações de esporozoítos de *Eimeria acervulina*,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  e  $1,5 \times 10^6$  foram testadas com cinco repetições, para incubação de 30 minutos e uma hora, em banho-maria a  $41^\circ\text{C}$ , levando-se em consideração a invasão às células primárias de rim de galinha e a homogeneidade dos resultados.

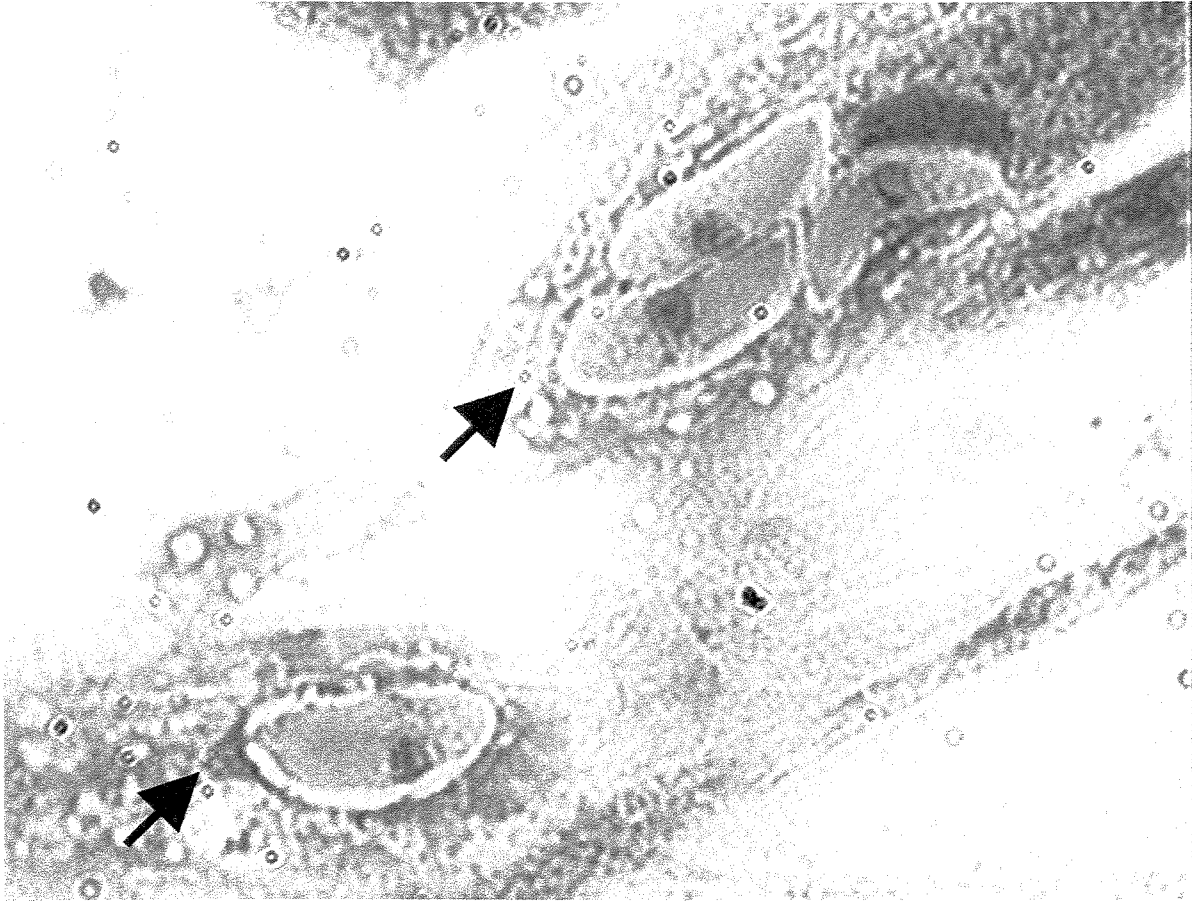
Através dos dados obtidos com a padronização do número de esporozoítos pôde-se observar que o inóculo de  $1 \times 10^6$  esporozoítos/ “well” apresentou resultados mais homogêneos quanto ao número de esporozoítos intracelulares, tanto nos resultados da contagem individual das lâminas quanto nas médias, nos dois tempos de incubação testados. Quanto aos dois outros inóculos testados ( $5 \times 10^5$  e  $1,5 \times 10^6$  esporozoítos/ “well”), tanto o número de esporozoítos intracelulares para cada lâmina quanto as médias para cada tempo de incubação mostraram variação. Desta forma, optou-se pelo uso de concentrações de  $1 \times 10^6$  esporozoítos/ “well” e tempo de incubação de 30 minutos e 1 hora para os testes de invasão/ inibição dos esporozoítos (figura 2).

---



**Figura 2.** Células primárias de rim de galinha infectadas com esporozoítos de *Eimeria acervulina*. As setas mostram esporozoítos intracelulares, dentro do vacúolo parasitóforo (Aumento=1000x).

Para *E. tenella* as mesmas concentrações de  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  e  $1,5 \times 10^6$  foram testadas quanto à invasão às células primárias de embrião de galinha. Somente nos testes com  $5 \times 10^5$  esporozoítos/ “well” foi possível realizar a contagem de esporozoítos intracelulares. Nas outras concentrações houve significante destruição celular devido ao excesso de esporozoítos. Assim, a concentração de  $5 \times 10^5$  esporozoítos/ “well” foi a escolhida (figura 3).



**Figura 3.** Células primárias de embrião de galinha infectadas com esporozoítos de *Eimeria tenella*. As setas mostram esporozoítos intracelulares, dentro do vacúolo parasitóforo (Aumento=1000x).

A diferença entre o número de esporozoítos de *E. tenella* e *E. acervulina* a ser utilizado é justificado pela maior suscetibilidade de *E. tenella* para a invasão de células *in vitro* do que a *E. acervulina* (AUGUSTINE, 2001).

#### **6.3.4. Cultura de células primárias de rim de galinha**

As células para cultivo *in vitro* foram extraídas de rins de pintos da linhagem “Hy-line”- 36, com idade entre 1 e 7 dias. Os rins retirados foram processados com tripsina (HOFMANN & RAETHER, 1990) e neutralizados com soro fetal bovino, à temperatura de 4°C. As células obtidas foram contadas, cultivadas em meio 199 em número de  $5 \times 10^5$  células/ “well”, incubadas inicialmente a 37°C com atmosfera de 4,5% de CO<sub>2</sub> e posteriormente a 40,5°C com atmosfera de 5,0% (DORAN, 1971 e HOFMANN & RAETHER, 1990) em incubadora apropriada. As células foram cultivadas sobre lamínulas redondas em placas de poliestireno de 24 “wells” COSTAR®, por um período de 72 horas.

#### **6.3.5. Cultura de células primárias de embrião de galinha**

As células foram extraídas de embriões de pintos da linhagem “White Leghorn”, com 10 dias de desenvolvimento. Estes, após retirados, foram processados com tripsina, da mesma maneira que os tecidos de rins (HOFMANN & RAETHER, 1990) e neutralizadas através de soro fetal bovino à baixa temperatura. As células obtidas foram contadas, cultivadas em meio 199 em número de  $2 \times 10^5$  células/ “well”, incubadas inicialmente a 37°C com atmosfera de 4,5% de CO<sub>2</sub> e posteriormente a 40,5°C com atmosfera de 5,0% (DORAN, 1971 e HOFMANN & RAETHER, 1990) em incubadora apropriada. As células foram cultivadas sobre lamínulas redondas em placas de poliestireno de 24 “wells” COSTAR®, por um período de 72 horas. Este material foi fornecido pela empresa FORT DODGE.

---

### 6.3.6. Lectinas de plantas

Foram testadas as seguintes lectinas isoladas de sementes de leguminosas, fornecidas pelo Prof. Dr. Benildo Souza Cavada da Universidade Federal do Ceará (Quadro 2):

**Quadro 2.** Características das lectinas utilizadas.

Lectina	Espécie isolada	pH no qual assume forma ativa (tetrâmero)
DVir	<i>Dioclea virgata</i>	pH $\geq$ 6,5
CF	<i>Cratylia floribunda</i>	pH $\geq$ 6,5
Dviol	<i>Dioclea violacea</i>	pH $\geq$ 4,5
DGr	<i>Dioclea grandiflora</i>	pH $\geq$ 4,5
ConBr	<i>Canavalia brasiliensis</i>	Mistura de dímeros e tetrâmeros mesmo até pH 8,0
PP	<i>Parkia platycephala</i>	pH 4,5 – 8,5: comporta como dímero não dependente de pH

Todas as lectinas relacionadas, além de uma estrutura molecular conservada, possuem a mesma especificidade por Manose/Glicose (DAM *et al.*, 1998; MANN *et al.*, 2001).

### 6.3.7. Efeito do tratamento dos esporozoítos com as lectinas

Os testes com as lectinas de plantas foram realizados com *Eimeria acervulina* 'I' e *E. tenella* 'PAL', linhagens isoladas e mantidas no Departamento de Parasitologia da UNICAMP pela Profa. Dra. Urara Kawazoe.

Os testes de invasão na presença das lectinas foram realizados *in vitro* utilizando-se as culturas de células primárias de rim e de embrião de galinha das linhagens "Hy-line" - 12 e "White Leghorn", respectivamente. As lectinas foram testadas nas concentrações de 50µg/ml e 100µg/ml, incubadas em banho-maria na presença dos esporozoítos, em solução

---



tampão de 10mM de HEPES e 250mM de sacarose, a 41°C por 30 e 60 minutos. Estes foram inoculados em quadruplicata ou triplicata com  $1 \times 10^6$  esporozoítos/ “well” para *E. acervulina* e  $5 \times 10^5$  esporozoítos/ “well” para *E. tenella*, nas culturas de células e incubados a 40,5° C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 horas para permitir o processo de invasão. As lamínulas com as células testadas foram fixadas com álcool metílico por 10 minutos e coradas com solução de Giemsa durante 30 minutos. O processo de invasão foi analisado em microscópio óptico (marca Zeiss), com aumento de 1000x.

### **6.3.8. Efeito do tratamento das células com as lectinas sobre a invasão dos esporozoítos**

Os efeitos das lectinas sobre as células cultivadas *in vitro* no processo de invasão de esporozoítos foram avaliados, utilizando-se *E. acervulina* ‘I’. Os testes de invasão na presença das lectinas foram realizados *in vitro* utilizando-se as culturas de células primárias de embrião de galinha da linhagem “White Leghorn”. As lectinas foram testadas na concentração de 100µg/ml, incubadas na presença das células de embrião cultivadas sobre lamínulas nas placas de 24 “wells” em meio 199, a 41° C por 60 minutos. Após esse período, as células foram lavadas com o meio de cultura com a reposição de um novo meio. Foram inoculados  $1 \times 10^6$  esporozoítos / “well” nas culturas de células, incubados a 40,5°C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 horas, em triplicata, para permitir o processo de invasão. As lamínulas com as células testadas foram fixadas com álcool metílico por 10 minutos e coradas com solução de Giemsa durante 30 minutos. O processo de invasão foi analisado em microscópio óptico (marca Zeiss), com aumento de 1000x.

---

### 6.3.9. Efeito da D-manose no tratamento dos esporozoítos com DViol

Com o objetivo de avaliar diretamente a influência da especificidade ao açúcar D-manose (DAM *et al.*, 1998) no efeito de inibição das lectinas testadas, foram realizados testes de inibição de invasão de esporozoítos de *E. tenella* e *E. acervulina* na presença da lectina *Dioclea violacea* (Dviol), em células primárias de rim e de embrião de galinha, respectivamente. O tratamento dos esporozoítos com a lectina na presença do açúcar de especificidade poderá alterar a capacidade do feito inibitório do tratamento realizado apenas com a lectina se esse for o mecanismo de ação envolvido. Apesar das seis lectinas apresentarem a mesma especificidade, DViol foi escolhida por ter apresentado resultados uniformes nos testes de inibição da invasão anteriores.

O açúcar utilizado foi a D-manose pela qual as lectinas estudadas apresentam maior afinidade. Tendo em vista a concentração inibitória mínima da D-manose de 6,1mM necessária para inibir a hemaglutinação de eritrócitos de coelho causada por DViol (DAM *et al.*, 1998), optou-se por utilizar a concentração de 20mM.

Os esporozoítos de *E. tenella* foram inoculados, em triplicata, com número de  $5 \times 10^5$  /“well” nas culturas de células primárias de rim de galinha e incubados a 40,5°C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 4 horas, para permitir o processo de invasão. Os seguintes tratamentos foram utilizados:

- Esporozoítos incubados em solução tampão fosfato (PBS) pH 7,6 em banho-maria a 41°C, por 1 hora (controle)
  - Esporozoítos incubados em PBS pH 7,6 em banho-maria a 41°C, por 60 minutos, na presença de 100µg/ml de DViol
-

- Esporozoítos incubados em PBS pH 7,6 em banho-maria a 41°C, por 60 minutos, na presença de 100µg/ml de DViol e 20mM de D-manose.

As lamínulas com as células testadas foram fixadas com álcool metílico por 10 minutos e coradas com solução de Giemsa durante 30 minutos. O processo de invasão foi analisado em microscópio óptico (marca Zeiss), com aumento de 1000x.

Nos experimentos com *E. acervulina* foram inoculados, em triplicata,  $1 \times 10^6$  esporozoítos /“well” nas culturas de células primárias de embrião de galinha e incubados a 40,5°C e 5% de CO<sub>2</sub>, durante 4 horas, para permitir o processo de invasão. Os seguintes tratamentos foram utilizados:

- Esporozoítos incubados em solução tampão de 250mM de sacarose e 10mM de HEPES, pH 7,2 em banho-maria a 41°C, por 60 minutos (controle)
- Esporozoítos incubados em solução tampão de 250mM de sacarose e 10mM de HEPES, pH 7,2 em banho-maria a 41°C, por 60 minutos, na presença de 100µg/ml de DViol
- Esporozoítos incubados em solução tampão de 250mM de sacarose e 10mM de HEPES, pH 7,2 em banho-maria a 41°C, por 60 minutos, na presença de 100µg/ml de DViol e 20mM de D-manose.

As lamínulas com as células testadas foram fixadas com álcool metílico, por 10 minutos, e coradas com solução de Giemsa durante 30 minutos. O processo de invasão foi analisado em microscópio óptico (marca Zeiss), com aumento de 1000x.

#### **6.4. Teste de Integridade da Membrana**

Na tentativa de elucidar os mecanismos de ação das seis lectinas sobre a membrana dos esporozoítos de *E. acervulina*, foram realizados testes de citometria de fluxo. Em 1991,

---

RAETHER *et al.* demonstraram que a análise de integridade da membrana, através de citometria de fluxo, mostrou-se relevante na determinação da atividade parasiticida e no modo de ação de determinadas drogas. A análise de integridade da membrana em citometria de fluxo funciona de maneira análoga aos testes de exclusão por coloração com tripan “blue” ou eosina. As células coradas representam aquelas nas quais houve perda da integridade de membrana (inviáveis) enquanto as células não coradas mantêm sua membrana íntegra (viáveis) (GUENTHER, 2001). Assim, é possível verificar se o efeito inibitório das lectinas sobre a invasão dos esporozoítos às células ocorre através de mecanismos destrutivos para os mesmos.

O número de esporozoítos de *E. acervulina* utilizado foi de  $2 \times 10^6$  /tratamento, com concentrações de 50µg/ml e 100µg/ml das lectinas e tempo de incubação de 30 e 60 minutos, em solução tampão 10mM HEPES/ 250mM sacarose.

As medidas de citometria de fluxo foram realizadas em um aparelho “FacStar Plus” (Becton-Dickinson). A emissão de fluorescência foi determinada utilizando um filtro de 530 nm e os resultados foram analisados em programa “CellQuest” (Becton-Dickinson). A sonda utilizada foi “Sytox Green” (Molecular Probes, Pitchford, USA), que marca pela emissão de fluorescência o material nuclear das células danificadas. Assim, a emissão de fluorescência corresponde à perda de integridade da membrana das células avaliadas. A concentração da sonda foi de 1/10000 em relação à amostra.

Os testes com citometria de fluxo foram realizados no Instituto de Bioquímica da Universidade de São Paulo (USP) sob a orientação do Prof. Dr. Robert Ivan Schumacher.

O mesmo experimento não foi realizado para *E. tenella* pelo fato desta espécie, em relação à *E. acervulina*, ter sofrido menor efeito das lectinas nos testes de invasão/ inibição.

---

## **6.5. Análise Estatística**

A análise estatística dos testes de invasão/ inibição foi realizada pela análise de variância, utilizando o programa SAS (1998) de estatística ( $\alpha=0,05$ ).

---

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Testes de Invasão/ Inibição de esporozoítos de *Eimeria acervulina* tratados com seis lectinas de planta, às células primárias de rim de galinha

Os resultados referentes aos testes de invasão/ inibição dos esporozoítos de *E. acervulina* tratados com DVir, DViol, CF, DGr, ConBr e PP nas concentrações de 50µg/ml e 100µg/ml, com tempos de incubação de 30 e 60 minutos encontram-se na **tabela 1**. O pré-tratamento com as lectinas mostrou capacidade de inibição do processo de invasão dos esporozoítos tratados, tendo sido encontrado número reduzido de formas intracelulares em relação aos controles, nas concentrações de 100µg/ml de lectina, exceto para ConBr.

**Tabela 1.** Média de esporozoítos intracelulares de *Eimeria acervulina*, pré-tratados com seis lectinas de planta, em células primárias de rim de galinha.

		Média de esporozoítos intracelulares *					
Tempo de incubação	Tratamento	DVir	DViol	CF	DGr	ConBr	PP
30 minutos	Controle	86,7a	101,0a	133,7a	154,7a	74,0a,b	39,3a
	50µg/ml	50,5b	45,0c	42,7b	60,2c	108,5a	31,0a,b
	100µg/ml	15,7d	7,0e	37,7b,c	5,0e	98,2a	15,0b
60 minutos	Controle	77,7a	88,5b	39,0b	91,5b	34,2b, c	43,6a
	50µg/ml	50,5b	28,5d	21,7c	32d	49,5b, c	26a,b
	100µg/ml	30,7c	1,0e	0,0d	5,0e	10,0c	17,3b

As variáveis seguidas de mesma letra em mesma coluna não diferem significativamente pela análise de variância utilizando o teste de Duncan, do programa SAS de estatística ( $\alpha=0,05$ ).

\*Em 100 campos microscópicos (aumento 1000x).

O tratamento dos esporozoítos de *E. acervulina* com a lectina DVir apresentou efeito inibitório da invasão constatado pela redução da média de esporozoítos intracelulares

em relação ao controle, estatisticamente significante nas duas concentrações e nos dois tempos de incubação utilizados. As concentrações de 100µg/ml apresentaram maior redução na média de esporozoítos intracelulares: 86,7 no controle contra 15,7 no tratado, com tempo de incubação de 30 minutos e 77,7 no controle contra 30,7 no tratado, com 60 minutos de incubação (**tabela 1, figura 4A e 5A**).

No tratamento dos esporozoítos com a lectina DViol observou-se redução estatisticamente significativa ainda maior da média de esporozoítos intracelulares em relação ao controle na concentração de 100µg/ml. A redução do número de esporozoítos intracelulares nessa concentração foi de 101 no controle e 7 no tratado, com tempo de incubação de 30 minutos e 88,5 controle contra 1 no tratado, com tempo de incubação de 60 minutos (**tabela 1, figura 4B e 5B**).

O tratamento dos esporozoítos com CF apresentou maior redução da média de esporozoítos intracelulares em relação ao controle na concentração de 100µg/ml com 60 minutos de incubação: 39 no controle e nenhum esporozoíto intracelular encontrado no tratado. Apesar do controle ter apresentado um valor baixo, a diferença com os tratados, tanto de 50µg/ml quanto de 100µg/ml foi estatisticamente significante. Com 30 minutos de incubação houve diferença estatisticamente significante em relação ao controle (133,7) mas não entre os tratamentos (42,7 para 50µg/ml e 37,7 para 100µg/ml) (**tabela 1, figura 4C e 5C**).

O teste com DGr apresentou redução estatisticamente significante na média de esporozoítos intracelulares em relação ao controle em todos os tratamentos. Com 50µg/ml e 30 minutos de incubação a redução foi de 154,7 (controle) para 60,2 e com 60 minutos de incubação, de 91,5 (controle) para 32. A maior redução na média de esporozoítos

---

intracelulares foi observada utilizando-se 100µg/ml de lectina, tanto para 30 como para 60 minutos de incubação, obtendo-se o valor de 5 esporozoítos (**tabela 1, figura 4D e 5D**).

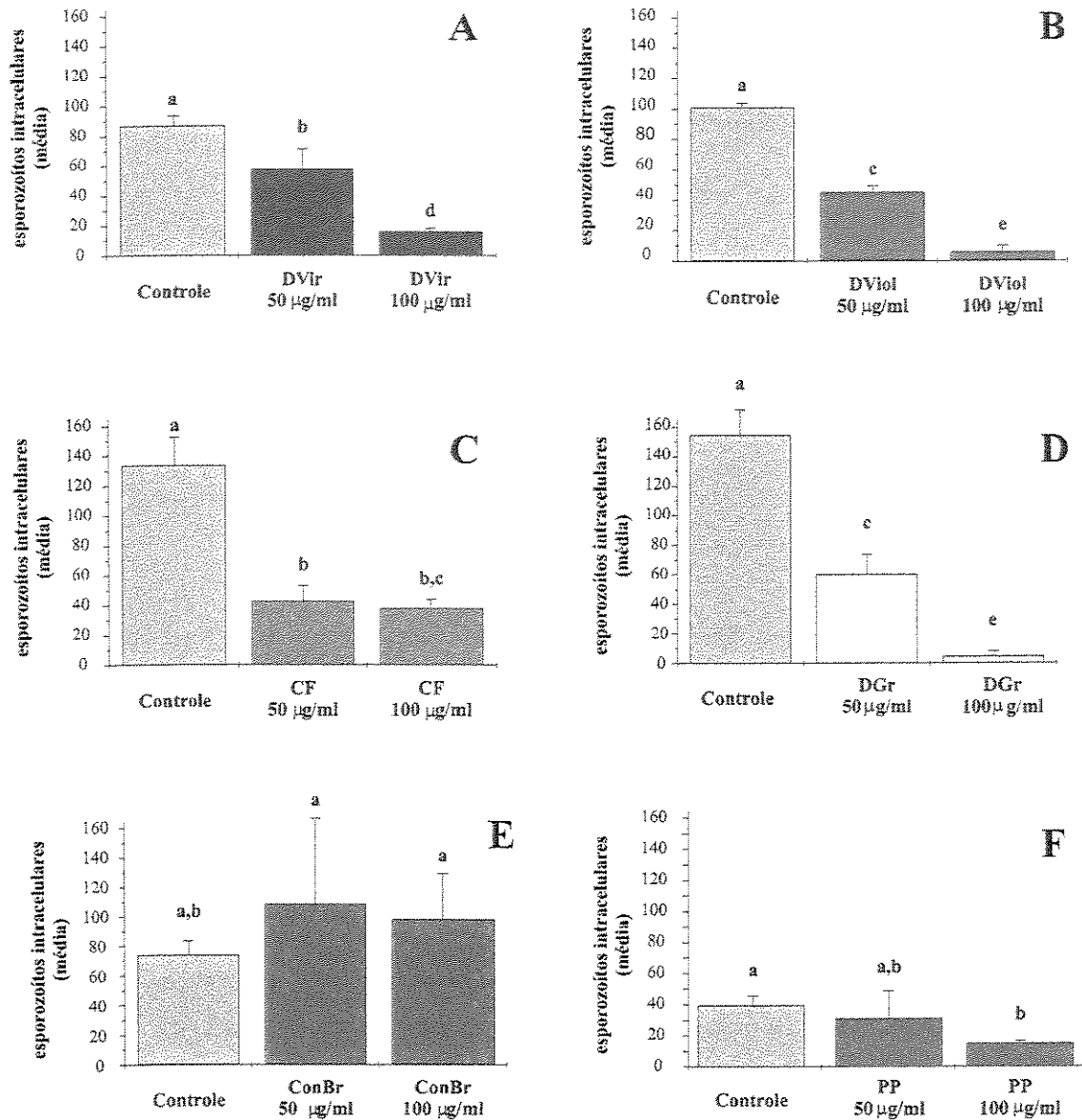
No tratamento realizado com a lectina ConBr não houve redução estatisticamente significativa sobre a média de esporozoítos intracelulares de *E. acervulina* em relação aos controles (**tabela 1, figura 4E e 5E**).

A lectina PP só apresentou redução estatisticamente significativa na média de esporozoítos intracelulares na concentração de 100µg/ml, de 39,3 no controle para 15 no tratado, com tempo de incubação de 30 minutos e de 43,6 (controle) para 17,3, com tempo de incubação de 60 minutos (**tabela 1, figura 4F e 5F**).

Como se pode observar, com exceção de ConBr, houve efeito inibitório dependente de concentração, maior no tratamento com 100µg/ml de lectina do que com 50µg/ml, constatado pela redução na média de esporozoítos intracelulares (**tabela 1, figuras 4 e 5**).

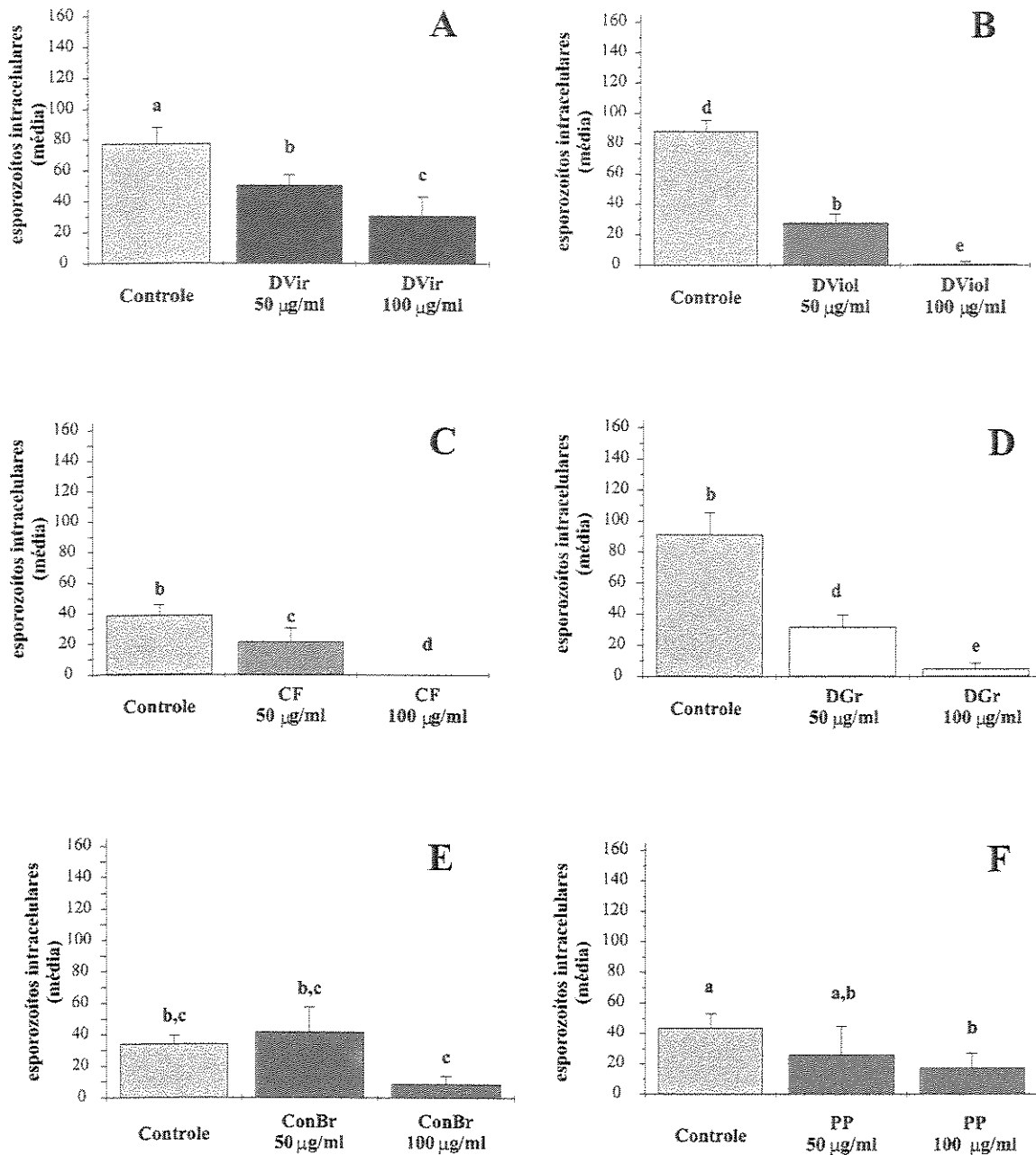
---





As variáveis seguidas de mesma letra não diferem significativamente pela análise de variância utilizando o teste de Duncan, do programa SAS de estatística ( $\alpha=0,0,5$ ). Esporozoítos intracelulares contados em 100 campos microscópicos, aumento=1000x (barras indicam desvio padrão)

**Figura 4.** Testes de invasão de *Eimeria acervulina* na presença das lectinas de planta DVir (A); DViol (B), CF (C), DGr (D), ConBr (E) e PP (F), em células primárias de rim de galinha. Tempo de incubação de 30 minutos.



As variáveis seguidas de mesma letra não diferem significativamente pela análise de variância utilizando o teste de Duncan, do programa SAS de estatística ( $\alpha=0,05$ ). Esporozoítos intracelulares contados em 100 campos microscópicos, aumento=1000x (barras indicam desvio padrão)

**Figura 5.** Testes de invasão de *Eimeria acervulina* na presença das lectinas de planta DVir (A); DViol (B), CF (C), DGr (D), ConBr (E) e PP (F), em células primárias de rim de galinha. Tempo de incubação de 60 minutos.

## 7.2. Testes de Invasão/ Inibição de esporozoítos de *Eimeria acervulina* tratados com cinco lectinas de planta, às células primárias de embrião de galinha

Os testes de invasão/ inibição de esporozoítos de *E. acervulina* foram também realizados em células primárias de embrião de galinha utilizando-se cinco lectinas na concentração de 100µg/ml, com tempo de incubação de 60 minutos, com a finalidade de comparar com os testes realizados com células primárias de rim de galinha, para a mesma espécie. Outro objetivo desse teste foi comparar o efeito das cinco lectinas em um mesmo experimento, em relação a um mesmo controle.

**Tabela 2.** Média de esporozoítos intracelulares de *Eimeria acervulina* tratados com cinco lectinas de planta, em células primárias de embrião de galinha.

Tempo de incubação	Tratamento*	Média de esporozoítos intracelulares**
60 minutos	Controle	228,6a
	DViol	5,3b
	DVir	22b
	DGr	30,3b
	ConBr	29,3b
	CF	18b

As variáveis seguidas de mesma letra não diferem significativamente pela análise de variância utilizando o teste de Duncan, do programa SAS de estatística ( $\alpha=0,05$ ).

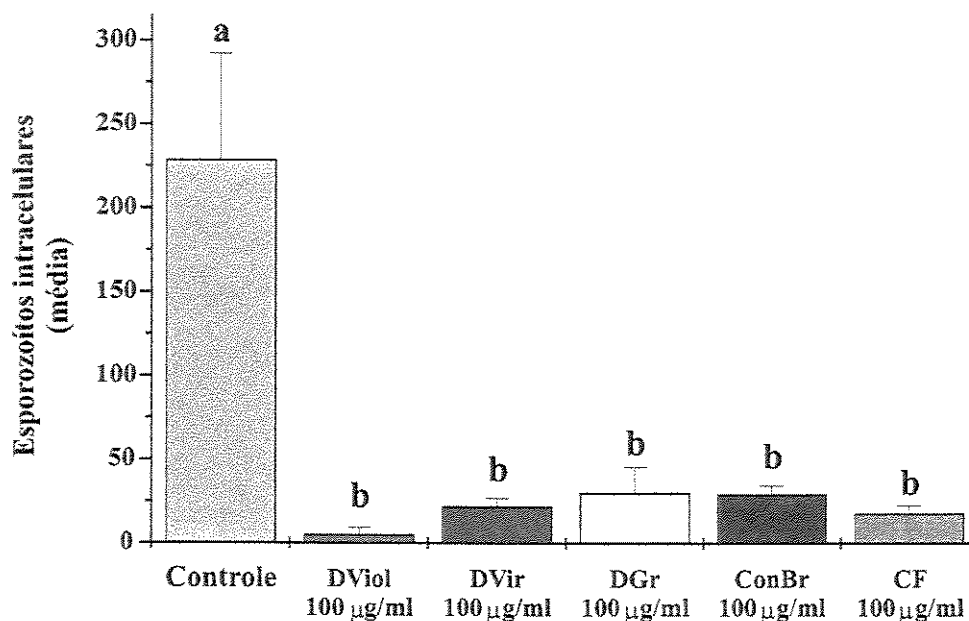
\*Tratamento com 100 µg/ml de lectina

\*\*Em 100 campos microscópicos (aumento 1000x).

Pode-se observar pela **tabela 2** e **figura 6** que o efeito de inibição da invasão demonstrado pelas lectinas nos experimentos utilizando células primárias de rim de galinha (**tabela 1** e **figuras 5A, B, C, D**) se confirmou para as células primárias de embrião de galinha. Além disso, a lectina ConBr que não havia apresentado diferença estatisticamente

---

significante entre a média de esporozoítos intracelulares testados e o seu controle, atuou com potencial igual às demais lectinas testadas. Não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre a média de esporozoítos intracelulares obtida em cada tratamento, o que sugere a semelhança na atividade das cinco lectinas, nas condições do presente experimento.



As variáveis seguidas de mesma letra não diferem significativamente pela análise de variância utilizando o teste de Duncan, do programa SAS de estatística ( $\alpha=0,05$ ). Esporozoítos intracelulares contados em 100 campos microscópicos, aumento=1000x (barras indicam desvio padrão).

**Figura 6.** Teste de invasão de *Eimeria acervulina* na presença de cinco lectinas de planta, em células primárias de embrião de galinha. Tempo de incubação de 60 minutos.

### 7.3. Testes de Invasão/ Inibição de esporozoítos de *Eimeria acervulina* às células primárias de embrião de galinha, pré-incubadas com lectinas

Foram realizados testes de inibição à invasão utilizando esporozoítos de *E. acervulina* e células primárias de embrião de galinha, tratadas com 100µg/ml das seis lectinas. O objetivo do presente experimento foi observar o efeito das lectinas sobre o processo de invasão dos esporozoítos pré-tratando as células ao invés dos esporozoítos, com a finalidade de estimar a existência ou não de atividade inibitória específica.

**Tabela 3.** Média de esporozoítos intracelulares de *Eimeria acervulina*, em células primárias de embrião de galinha, tratadas com seis lectinas de planta.

Tempo de incubação	Tratamento*	Média de esporozoítos intracelulares**
60 minutos	Controle	985,3a,b
	DViol	942,6a,b
	DVir	1022,6a,b
	DGr	897,3b
	ConBr	823,3b
	CF	968,6a,b
	PP	1117,3a

As variáveis seguidas de mesma letra não diferem significativamente pela análise de variância utilizando o teste de Duncan, do programa SAS de estatística ( $\alpha=0,05$ ).

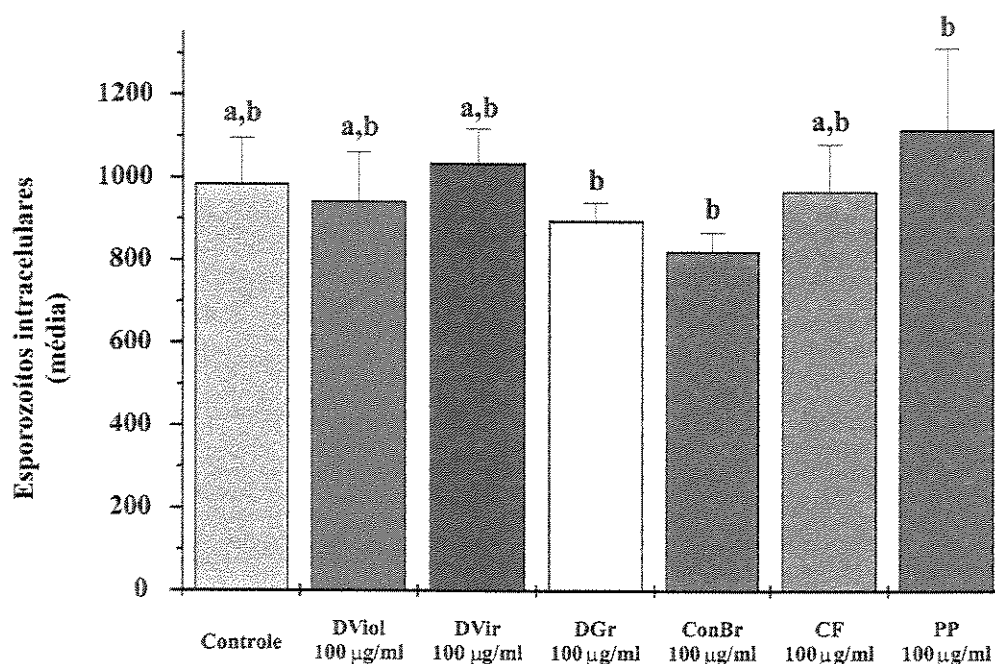
\*Tratamento com 100 µg/ml

\*\*Em 100 campos microscópicos (aumento 1000x).

Observou-se, neste experimento, que as médias de esporozoítos intracelulares foram bem maiores que as obtidas nos testes realizados com células de embrião de galinha, onde os esporozoítos sofreram tratamento prévio. Um dos fatores que poderia explicar os resultados seria, provavelmente, à menor exposição dos esporozoítos aos danos no presente experimento, pois não sofreram processos de lavagem e incubação prévia.

---

Este teste em que as células foram pré-tratadas com as lectinas DViol, DVir, DGr, ConBr, CF, PP e posteriormente infetadas com esporozoítos de *E. acervulina*, apresentou resultados estatisticamente semelhantes entre a média de esporozoítos intracelulares e o controle. Entre os tratamentos, apenas DGr e ConBr, que apresentaram pequena redução na média de esporozoítos intracelulares (897,3 e 923,3) em relação ao controle (985,3), obtiveram resultados estatisticamente diferentes de PP, com média um pouco maior (117,3) que o controle.(tabela 3 e figura 7).



As variáveis seguidas de mesma letra não diferem significativamente pela análise de variância utilizando o teste de Duncan, do programa SAS de estatística ( $\alpha=0,05$ ).  
Esporozoítos intracelulares contados em 100 campos microscópicos, aumento=1000x (barras indicam desvio padrão)

**Figura 7.** Teste de invasão de *Eimeria acervulina* em células de embrião de galinha cultivadas *in vitro* tratadas com seis lectinas de planta. Tempo de incubação de 60 minutos.

#### 7.4. Testes de Invasão/ Inibição de esporozoítos de *Eimeria tenella* tratados com seis lectinas de planta, às células primárias de embrião de galinha

Para os testes de inibição à invasão, realizados com *E. tenella*, foram utilizadas células de embrião de galinha da linhagem “White Leghorn”, pelo fato dos testes realizados com *E. acervulina* não terem apresentado diferença significativa nos resultados obtidos com células de rim ou embrião de galinha, além das razões expostas em Material e Métodos.

Os esporozoítos de *E. tenella* foram tratados com DVir, DViol, CF, DGr, ConBr e PP nas concentrações de 50µg/ml e 100µg/ml, com tempos de incubação de 30 e 60 minutos. Os tratamentos com DVir, DViol, ConBr e PP se mostraram capazes de inibir o processo de invasão, tendo sido encontrada média reduzida de esporozoítos intracelulares em relação aos controles (tabela 4).

**Tabela 4.** Média de esporozoítos intracelulares de *Eimeria tenella* tratados com seis lectinas de planta, em células primárias de embrião de galinha.

		Média de esporozoítos intracelulares *					
Tempo de incubação	Tratamento	DVir	DViol	CF	DGr	ConBr	PP
30 minutos	Controle	645 a	575,5 a	470 a	415,7 a	770 a	929,3a
	50µg/ml	319 d	210 b	496,7 a	411 a	517,6 b	612b
	100µg/ml	336,3 d, c	501 a	494,3 a	362 a	449 b	641,6b
60 minutos	Controle	486 b	491,5 a	569,5 a	413 a	783,6 a	877,6a
	50µg/ml	397 c, b, d	163 b	428,3 a	354,7 a	474 b	363,6c
	100µg/ml	466,3 b, c	250,6 b	535,7 a	442 a	510,6 b	622,3b

As variáveis seguidas de mesma letra em mesma coluna não diferem significativamente pela análise de variância utilizando o teste de Duncan, do programa SAS de estatística ( $\alpha=0,05$ ).

\*Em 100 campos microscópicos (aumento 1000x).

O tratamento com a lectina DVir apresentou redução da média de esporozoítos intracelulares de *E. tenella*, somente com tempo de incubação de 30 minutos. Para esse tempo, a média de esporozoítos intracelulares não variou entre as concentrações de lectina, tendo sido reduzido de 645 (controle) para 319 no tratamento com 50µg/ml e para 336,3 no tratamento com 100µg/ml (**tabela 4 e figuras 8A, 9A**).

Nos testes realizados com DViol, não foi observada alteração estatisticamente significativa da média de esporozoítos intracelulares na concentração de 100µg/ml com 30 minutos de incubação. Os tratamentos com 50µg/ml durante 30 e 60 minutos e de 100µg/ml com 60 minutos de incubação apresentaram redução na média de esporozoítos intracelulares estatisticamente significativa em relação aos controles (575,5 para 30 minutos e 491,5 para 60 minutos) porém não entre si, tendo obtido valores de 210, 163 e 250,6, respectivamente (**tabela 4 e figuras 8B, 9B**).

Os esporozoítos de *E. tenella*, tratados com as lectinas CF e DGr apresentaram pouca alteração no processo de invasão, não tendo sido observado efeito estatisticamente significativo entre a média de esporozoítos intracelulares entre os tratamentos e os controles (**tabela 4 e figuras 8C, D, 9C, D**).

A lectina ConBr apresentou redução na média de esporozoítos intracelulares estatisticamente significativa em relação aos controles em todos os tratamentos, contrastando com os resultados obtidos com *E. acervulina* para os quais a mesma não apresentou efeito. Não houve variação estatisticamente significativa entre a média de esporozoítos intracelulares obtidos em cada tratamento (**tabela 4 e figuras 8E, 9E**).

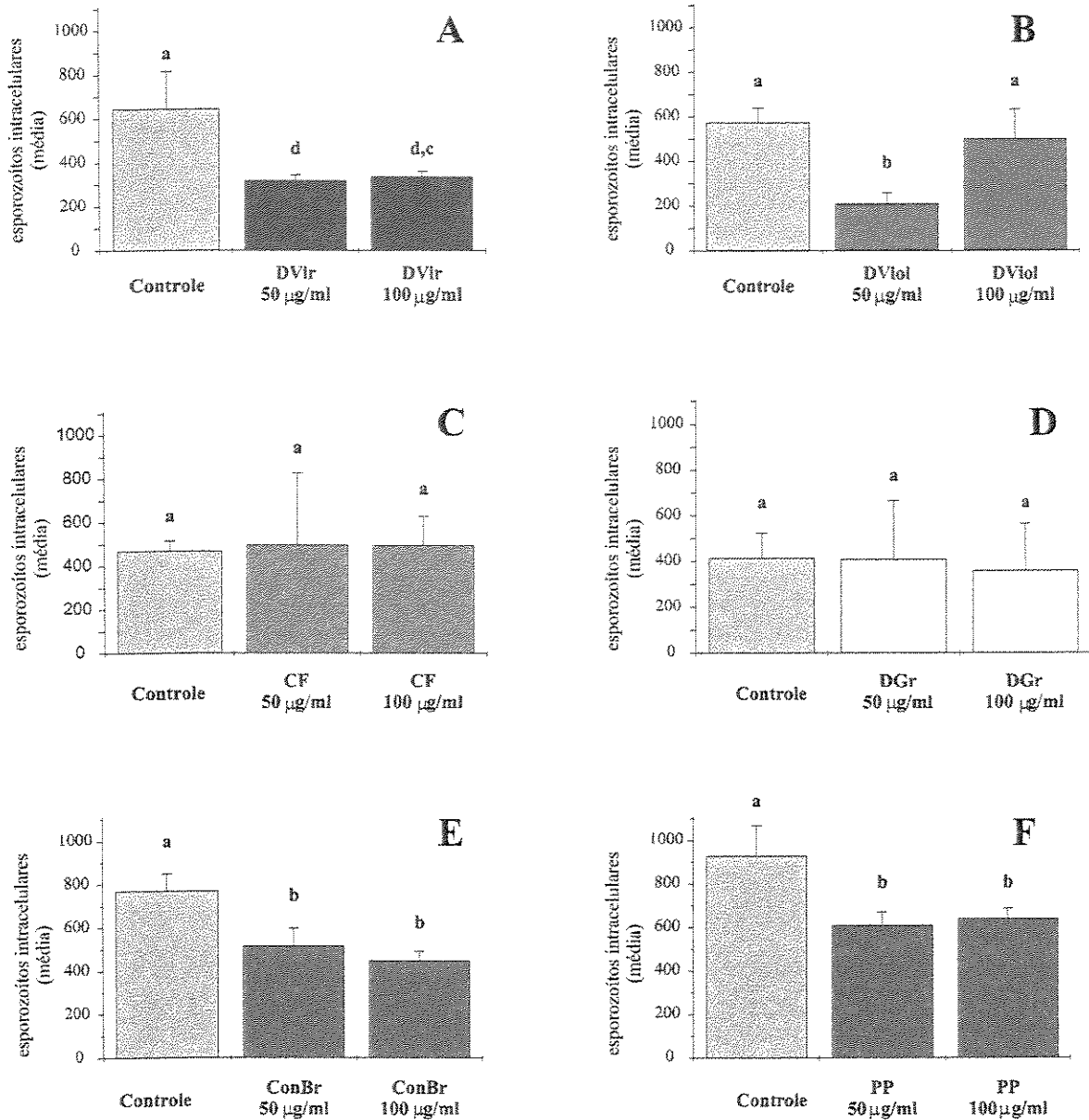
A lectina PP que não havia apresentado efeito de inibição à invasão dos esporozoítos de *E. acervulina*, reduziu a média de esporozoítos intracelulares de *E. tenella*

---



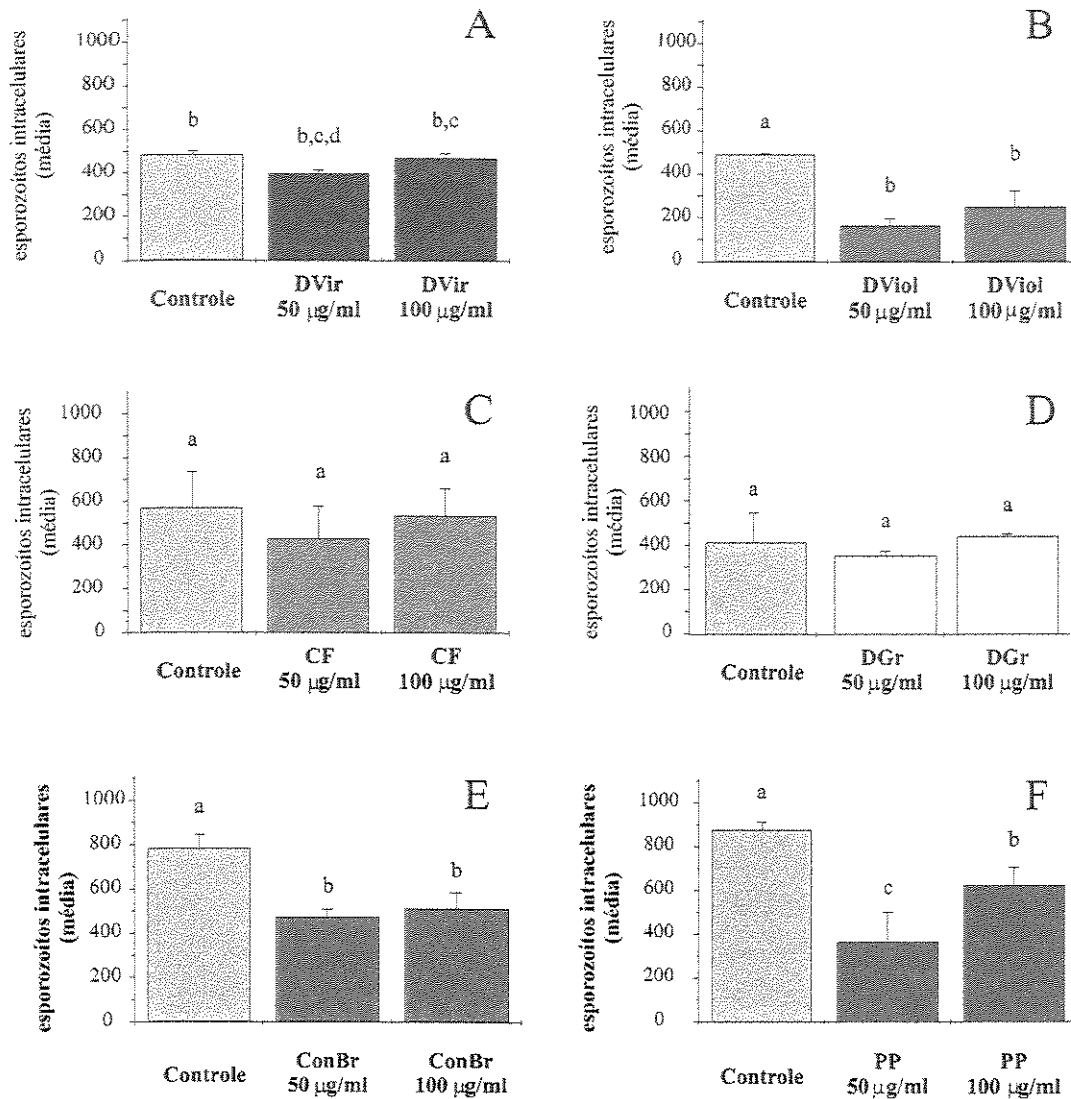
em relação aos controles. As médias de formas intracelulares foram reduzidas de 929,3 (controle de 30 minutos) para 612 com 50µg/ml e para 641,6 com 100µg/ml. Para a incubação de 60 minutos, o valor do controle foi de 877,6 enquanto no tratamento com 50µg/ml e 100µg/ml os resultados foram respectivamente de 363,6 (maior redução na média de esporozoítos celulares) e 622,3 (**tabela 4 e figuras 8F, 9F**).

---



As variáveis seguidas de mesma letra não diferem significativamente pela análise de variância utilizando o teste de Duncan, do programa SAS de estatística ( $\alpha=0,05$ ). Esporozoitos intracelulares contados em 100 campos microscópicos, aumento=1000x (barras indicam desvio padrão)

**Figura 8.** Testes de invasão de *Eimeria tenella* na presença das lectinas de planta DVir (A); DViol (B), CF (C), DGr (D), ConBr (E) e PP (F), em células primárias de embrião de galinha. Tempo de incubação de 30 minutos.



As variáveis seguidas de mesma letra não diferem significativamente pela análise de variância utilizando o teste de Duncan, do programa SAS de estatística ( $\alpha=0,05$ ). Esporozoítos intracelulares contados em 100 campos microscópicos, aumento=1000x (barras indicam desvio padrão)

**Figura 9.** Testes de invasão de *Eimeria tenella* na presença das lectinas de planta DVir (A); DViol (B), CF (C), DGr (D), ConBr (E) e PP (F), em células primárias de embrião de galinha. Tempo de incubação de 60 minutos.

### **7.5. Teste de Integridade da Membrana de esporozoítos de *Eimeria acervulina* tratados com seis lectinas de planta**

Através do teste de citometria de fluxo foi possível analisar a ação das seis lectinas sobre a integridade da membrana dos esporozoítos de *E. acervulina*. Essa espécie foi escolhida para a realização deste experimento por ter sido a mais sensível ao tratamento com as lectinas. Na **tabela 5**, pode-se observar os valores de fluorescência captados, que correspondem à perda de integridade da membrana. Comparando-se os testes controles de 30 minutos (23,1) e de 60 minutos (24,0), nenhuma das lectinas apresentou diferença significativa de perda da integridade da membrana. As lectinas que apresentaram maior emissão de fluorescência foram DVir com 46,6 no tratamento de 50µg/ml e tempo de incubação de 30 minutos, DViol com 44,5 no tratamento com 100µg/ml 60 minutos de incubação e DGr com 39,2 no tratamento com 50µg/ml e 30 minutos. Estes resultados parecem não ter causado danos significantes à membrana, segundo a análise do Programa Cell-Quest. Observando-se os resultados das seis lectinas, não houve relação entre a exposição dos esporozoítos a concentrações das lectinas ou ao tempo de incubação, com os danos provocados às membranas dos parasitas. Por outro lado, as concentrações das lectinas que apresentaram maior atividade de inibição à invasão nos testes com cultura de células não corresponderam às concentrações que causaram maior perda de integridade da membrana nos testes de citometria de fluxo.

---

**Tabela 5.** Teste de Integridade da membrana dos esporozoítos de *Eimeria acervulina* na presença de seis lectinas de planta, por meio de citometria de fluxo.

Lectinas	Valores médios de emissão de fluorescência			
	Tratamento*			
	30 minutos		1 hora	
	50µg/ml	100µg/ml	50µg/ml	100µg/ml
DVir	46,6	25,3	23,3	26,4
DViol	23,1	31,9	25,5	44,5
CF	26,4	23,9	23,1	23,5
DGr	39,2	28,0	23,1	31,9
ConBr	34,0	27,9	29,4	22,7
PP	32,5	28,1	28,6	22,7

\*Valores de emissão de fluorescência dos controles:

30 minutos = 23,1 e 60 minutos = 24,0.

### 7.6. Influência da D-manose no tratamento dos esporozoítos de *Eimeria acervulina* e *E. tenella* com DViol

Com o objetivo de avaliar a influência direta da especificidade por manose (DAM *et al.*, 1998) no efeito de inibição à invasão apresentado pelas lectinas, foram realizados os testes de invasão/ inibição de esporozoítos de *E. tenella* e *E. acervulina* na presença da lectina DViol.

A lectina DViol já havia sido testada quanto a sua capacidade de inibição à invasão dos esporozoítos de *E. acervulina* e *E. tenella*, mostrando acentuada redução na média de esporozoítos intracelulares em ambas as espécies, em relação aos seus respectivos

controles, na concentração de 100µg/ml e o tempo de incubação de 60 minutos. Esta lectina foi escolhida tendo em vista o seu poder inibitório e a uniformidade nos resultados obtidos com as espécies mencionadas.

**Tabela 6.** Teste de influência da D-manose na invasão de esporozoítos de *Eimeria tenella* tratados com DViol, às células primárias de rim de galinha, com tempo de incubação de 60 minutos.

Tratamento	Média de Esporozoítos Intracelulares
100µg/ml de DViol	46,3b
100µg/ml de DViol + 20mM de D-manose	41b
Controle (sem lectina e D-manose)	135a

As variáveis seguidas de mesma letra não diferem significativamente pela análise de variância utilizando o teste de Duncan, do programa SAS de estatística ( $\alpha=0,05$ ).

\*Número de esporozoítos intracelulares em 100 campos microscópicos (aumento 1000x).

O experimento sobre efeito inibitório da invasão dos esporozoítos de *E. tenella* realizado com as células de rim de galinha no tratamento com DViol (**tabela 6 e figura 10A**), confirmou os resultados anteriormente obtidos com os testes em células de embrião de galinha (**tabela 4 e figuras 8B e 9B**), tendo apresentado redução estatisticamente significativa na média de esporozoítos intracelulares (46,3) em relação ao controle (135). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre a média de esporozoítos intracelulares encontrada nesse tratamento (46,3) em relação ao tratamento com DViol + D-manose (41) (**tabela 6 e figura 10A**).

Nos experimentos com *E. acervulina*, utilizando-se o tampão 250mM sacarose / 10mM HEPES foram obtidos os seguintes resultados:

**Tabela 7.** Teste de influência da D-manose na invasão de esporozoítos de *Eimeria acervulina*, na presença da lectina DViol, às células primárias de embrião de galinha, com tempo de incubação de uma hora.

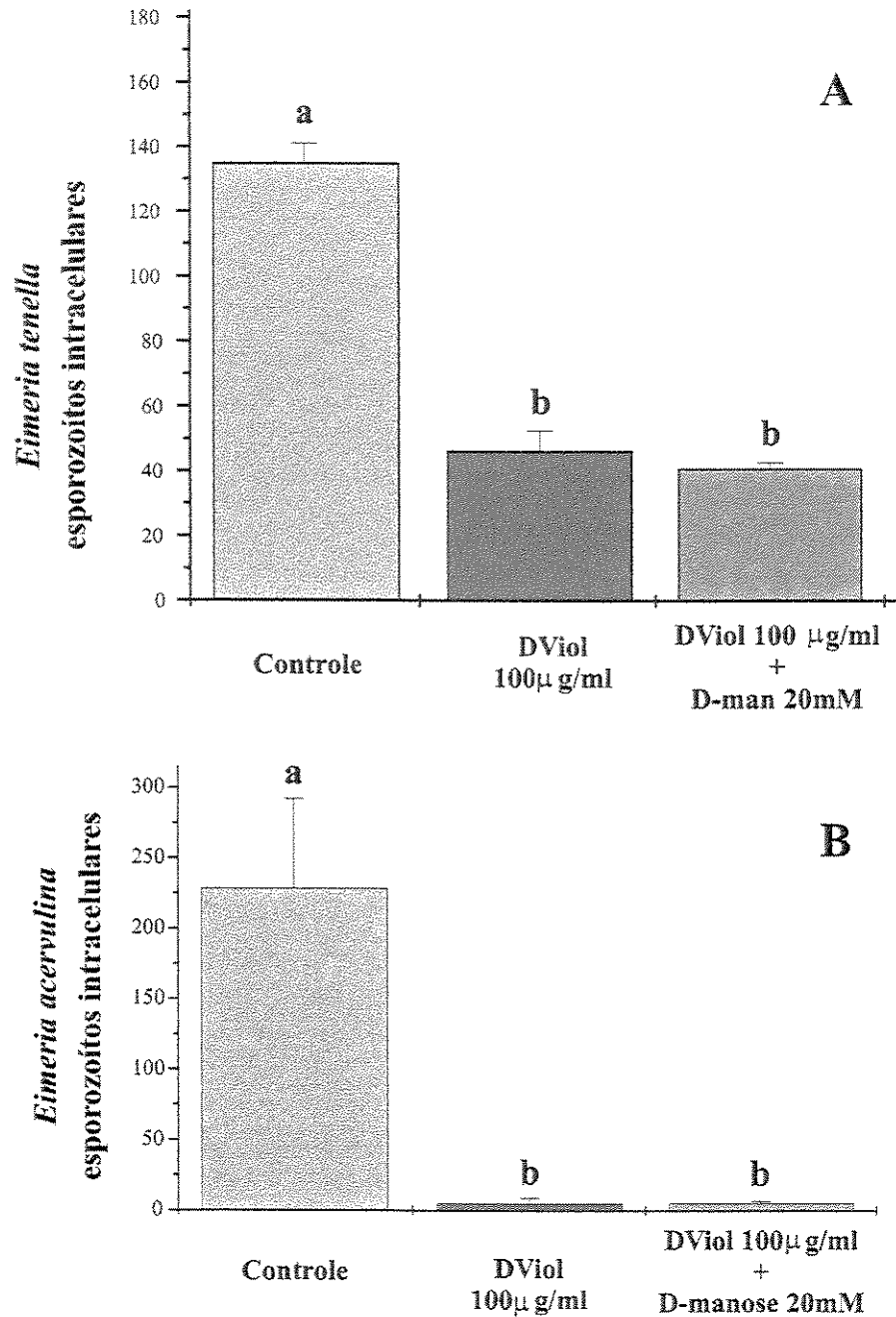
Tratamento	Média de Esporozoítos Intracelulares
100µg/ml de DViol	5,3b
100µg/ml de DViol + 20mM de D-manose	5,6b
Controle (sem lectina e D-manose)	228,6a

As variáveis seguidas de mesma letra não diferem significativamente pela análise de variância utilizando o teste de Duncan, do programa SAS de estatística ( $\alpha=0,05$ ).

\*Número de esporozoítos intracelulares em 100 campos microscópicos (aumento 1000x).

Como se pode observar pela **tabela 7** e **figura 10B**, a D-manose também não foi capaz de inibir o efeito exercido pela lectina sobre o processo de invasão dos esporozoítos de *E. acervulina*, pois não houve diferença estatística entre a média de esporozoítos intracelulares nos tratamentos com DViol, na ausência ou presença de manose, assim como aconteceu com *E. tenella*.

Através dos experimentos de invasão/ inibição na presença de D-manose não foi possível observar relação entre efeito inibitório da lectina DViol e sua especificidade pelo açúcar. O tratamento dos esporozoítos de *E. tenella* e *E. acervulina* com 100µg/ml de DViol apresentou resultados semelhantes ao tratados com 100µg/ml DViol na presença de 20mM de D-manose (**figura 10B**).



As variáveis seguidas de mesma letra não diferem significativamente pela análise de variância utilizando o teste de Duncan, do programa SAS de estatística ( $\alpha=0,05$ ). Esporozoítos intracelulares contados em 100 campos microscópicos, aumento=1000x (barras indicam desvio padrão)

**Figura 10.** Testes de inibição à invasão de esporozoítos de *Eimeria tenella* (A) e *E. acervulina* (B) tratados com DViol + D-manose, em células primárias de rim (A) e de embrião de galinha (B). Tempo de incubação de 60 minutos.



## 8. DISCUSSÃO

No presente estudo foram testadas as lectinas Diocleinae – DVir, DViol, DGr, ConBr e CF – e Mimosoideae – PP – no processo de invasão de esporozoítos de *Eimeria acervulina* e *E. tenella* às células primárias de rim e de embrião de galinha.

Os testes de invasão de esporozoítos de *E. acervulina* às células primárias de rim de galinha demonstraram redução estatisticamente significante do número de esporozoítos intracelulares, em relação aos controles, nos tratamentos com 100µg/ml de DVir, DViol, DGr, CF e PP. Para essas cinco lectinas foi observada uma relação direta entre o aumento da concentração e redução do número de esporozoítos intracelulares, porém o tempo de incubação dos esporozoítos na presença das lectinas não apresentou influência sobre os resultados obtidos. Por outro lado, o teste de inibição à invasão dos esporozoítos de *E. acervulina*, tratadas com as mesmas lectinas acima e com a mesma concentração, em células primárias de embrião de galinha, confirmou o efeito de redução estatisticamente significativa do número de esporozoítos intracelulares em relação ao controle, sem apresentar variação estatisticamente significante entre os tratamentos, representando maior uniformidade nos resultados. Além disso, foi constatado que as células de embrião de galinha se mostraram mais adaptadas para esses testes, pois o teste controle apresentou índice de invasão dos esporozoítos superior ao verificado com as células de rim de galinha.

Maior variação foi encontrada nos testes de invasão de esporozoítos de *E. tenella* tratadas com as lectinas e infectadas em células primárias de embrião de galinha. Foi observado efeito de inibição à invasão somente nos tratamentos com DVir, DViol, ConBr e PP, constatado pela redução do número de esporozoítos intracelulares. Esses tratamentos

---

não apresentaram um padrão de atuação em relação à concentração das lectinas e/ou o tempo de incubação.

Na tentativa de determinar a natureza da interação lectina-esporozoíto responsável pelo efeito de inibição à invasão, foi realizado o tratamento de esporozoítos de *E. acervulina* e *E. tenella* com DViol + D-manose, no intuito de avaliar a influência do açúcar de especificidade da lectina sobre o efeito inibitório dos esporozoítos. Verificou-se que a presença da D-manose, mesmo na concentração de 20mM, bem acima de 6,1 mM, necessária para a inibição da aglutinação de eritrócitos de coelho mediada por DViol (DAM *et al.*, 1998), apresentou resultado semelhante ao do teste sem a presença desse açúcar, não mostrando efeito inibitório adicional na interação lectina-esporozoíto.

Como complementação deste estudo, foi avaliada a possibilidade de efeito lítico das seis lectinas sobre os esporozoítos de *E. acervulina* pela análise em citometria de fluxo, cujos resultados demonstraram não ocorrer danos significativos à membrana dos esporozoítos, indicando que não houve perda da sua viabilidade.

Apesar de não ter sido possível determinar a natureza da interação lectina-esporozoíto no processo de inibição à invasão, sugere-se que essa interação esteja ligada especificamente ao esporozoíto, no caso da *E. acervulina*: o pré-tratamento das células de embrião com as seis lectinas não foi capaz de alterar o processo de invasão dos esporozoítos, tendo em vista que os resultados entre os tratados e o controle não tratado apresentaram valores semelhantes, sem diferença estatisticamente significativa. No entanto, houve variação significativa no índice de invasão dos esporozoítos entre os tratamentos com as lectinas.

Todas as lectinas testadas foram isoladas de sementes de leguminosas e possuem especificidade nominal conservada para manose/glicose que são monossacarídeos. Além

---

disso, possuem elevada afinidade pela região central de todos os carboidratos ligados a asparagina, no qual se encontra uma cadeia de trimanosídeo (DAM *et al.*, 1998). Essas características sugerem que apenas o teste da influência da D-manose, realizado no presente trabalho, não é suficiente para excluir a possível origem da ligação aos carboidratos específicos na interação entre as lectinas e os esporozoítos, uma vez que elas podem estar se ligando a diversos carboidratos complexos que possuam a unidade trimanosídica citada.

As lectinas testadas se caracterizam por exibir um equilíbrio dependente de pH, entre as formas dímero - tetrâmero. Entretanto, apenas a forma tetravalente possui capacidade de se ligar a receptores da membrana celular, disparando uma série de sinais de ativação para mecanismos intracelulares. A relação entre as formas divalente e tetravalente, associada a mudanças na orientação relativa dos sítios de ligação a carboidratos nas estruturas quaternárias de lectinas homólogas, têm sido responsáveis pelas diferenças nas atividades biológicas dessas lectinas (SANZ-APARICIO *te al.*, 1997; GRANGEIRO *et al.*, 1997). Os trabalhos de CALVETE *et al.* (1999) corroboram a hipótese de que pequenas diferenças nas posições da estrutura primária de lectinas filogeneticamente próximas, amplificadas pela oligomerização, podem causar um grande impacto no equilíbrio das formas dímero - tetrâmero, com conseqüências biológicas importantes.

Os testes foram realizados em solução tampão fosfato, pH 7,6 e solução tampão HEPES/sacarose, pH 7,2. Nesse intervalo de pH, as lectinas DVir, DViol, DGr e CF assumem a forma tetravalente que é ativa, a lectina ConBr apresenta uma mistura das formas dímero (inativa) e tetrâmero (ativa) e PP apresenta a forma de dímero (inativa). Pode-se sugerir que a concentração de formas ativas e diferenças nas estruturas quaternárias das lectinas utilizadas nos testes de invasão e de integridade das membranas dos esporozoítos seja responsável pela diversidade dos resultados obtidos no presente trabalho.

---

Diversos trabalhos sobre interação parasita-célula hospedeira, incluindo inúmeros parasitas intestinais, têm identificado glicoconjugados de membrana como receptores potenciais para a invasão, propondo que a adesão ocorre por meio de ligações lectina-glicoconjugado. Essa hipótese é reforçada pelo trabalho de ALROY *et al.*, (1989); SUPRASERT & FUJIOKA (1988) que relataram diferenças na distribuição de resíduos na superfície luminal do epitélio nos intestinos delgado, grosso e na região cecal das galinhas. Além disso, foi proposto que essas interações possam desempenhar um papel importante na especificidade dos esporozoítos de diversas espécies de *Eimeria*, pelo sítio de invasão, o que explicaria a localização específica das espécies de *Eimeria* aviária em diferentes sítios ao longo do tubo digestivo do hospedeiro.

STROUT *et al.* (1994) demonstraram, pela primeira vez, a presença de lectinas em *E. acervulina*, *E. tenella* e *E. maxima*, com especificidades diferentes da lectina ao açúcar, para cada espécie. Através de testes de inibição de hemaglutinação, esses autores determinaram que a lectina de *E. tenella* possuía especificidade para L-fucose, a de *E. acervulina* para D-arabinose e a de *E. maxima* não pode ser determinada, porém mostrou-se diferente das demais. Além disso, houve uma correlação entre o pH ótimo de atuação das lectinas detectadas e o pH das regiões do intestino colonizadas por essas espécies. ALROY *et al.* (1989) descreveram que ocorria diferença no pH ótimo de ligação das lectinas entre os glicoconjugados presentes na porção superior (pH 6,0), região inferior e cecal (pH 7,0) do intestino das galinhas.

AUGUSTINE (1985) observou o efeito de diversas lectinas sobre o processo de invasão de esporozoítos de *Eimeria meleagridis* (parasita de peru), entre elas ConA/Concanavalina A (isolada de sementes de *Canavalia ensiformis*) pertencente à

---

família Diocleinae, do mesmo gênero de ConBr, compartilhando a mesma estrutura molecular conservada e afinidade por manose/glicose. Dentre as lectinas testadas, somente WGA (“wheat germ agglutinin”) incubada previamente com as células cultivadas *in vitro* foi capaz de inibir a invasão dos esporozoítos. A autora sugere que a interação de WGA com a membrana celular ocorra por meio de ligações nas regiões aniônicas e não à N-acetilglicosamina, como evidenciado pelos resultados das outras lectinas testadas que, apesar de apresentarem a mesma especificidade da WGA não foram capazes de inibir a invasão.

BABA *et al.*(1996) propuseram que as lectinas estão localizadas na superfície das células hospedeiras e os carboidratos na superfície dos esporozoítos, ao contrário das observações dos autores anteriormente citados. As conclusões são baseadas em experimentos com lectinas específicas para D-galactose: o pré-tratamento com essas lectinas foi capaz de inibir a invasão de esporozoítos de *E. tenella*. Além disso, o tratamento das células cultivadas *in vitro* com D-galactose também inibiu a invasão dos esporozoítos.

Observando os resultados dos trabalhos acima citados, pode-se sugerir que a ligação das lectinas testadas às unidades glicídicas estejam localizadas na membrana dos esporozoítos envolvidas em alguma etapa do processo de adesão, reconhecimento e invasão das células hospedeiras. Pode-se ainda supor que a diferença entre a atuação das lectinas sobre *E. acervulina* e *E. tenella* seja consequência de diferente distribuição das unidades glicídicas interagindo com as mesmas. Essa hipótese também pode ser sugerida uma vez que, como foi verificado anteriormente, diferenças no padrão de distribuição de moléculas envolvidas no processo de invasão têm sido constatadas para as espécies de *Eimeria* que invadem diferentes regiões do intestino das aves.

---

As lectinas utilizadas no presente trabalho apresentam propriedades biológicas *in vitro* como: proliferação de linfócitos e produção de interferon  $\gamma$  (BARRAL-NETO *et al.*, 1992), estimulação de macrófagos intraperitoniais e reação inflamatória (RODRIGUEZ *et al.*, 1992), indução de edema de pata e imigração de células peritoniais em ratos (BENTO *et al.*, 1993; GOMES *et al.*, 1994; FERREIRA *et al.*, 1996). Experimentos *in vivo* com essas lectinas foram recentemente publicados por BARBOSA *et al.* (2001) demonstrando o efeito de ConBr, DViol e DGr na ativação de linfonodos de células T. Adicionalmente, foram constatados efeitos de apoptose e inflamação, freqüentemente associados com necrose de vênulas endoteliais.

Diversos estudos complementares serão necessários para esclarecer os efeitos dessas lectinas de plantas em espécies de *Eimeria*, tanto no processo de adesão envolvido na invasão celular, quanto no próprio tratamento da doença em animais. As lectinas por terem mostrado efeito inibitório à invasão celular *in vitro* e por demonstrarem diversas propriedades imunoestimulatórias em animais, podem se tornar alternativas promissoras no controle da coccidiose aviária.

---

## 9. CONCLUSÕES

A partir da hipótese de que as lectinas Diocleinae - DVir, DViol, CF, DGr, ConBr – e Mimosoideae – PP – seriam capazes de inibir a invasão dos esporozoítos de *Eimeria acervulina* e *E. tenella* às células primárias de rim e de embrião de galinha foram realizados os experimentos para sua comprovação, obtendo-se os seguintes resultados relevantes:

- As células primárias de embrião de galinha se mostraram mais apropriadas do que as células primárias de rim de galinha para a execução dos testes de invasão, uma vez que o índice de invasão pelos esporozoítos com o primeiro tipo de células foi maior tanto para *E. acervulina* quanto para *E. tenella*.
  - As concentrações de 100µg/ml das lectinas DVir, DViol, CF, DGr e PP foram eficientes para inibir a invasão dos esporozoítos de *E. acervulina* às células primárias de rim e de embrião de galinha, tanto com 30 quanto com 60 minutos de incubação.
  - As concentrações de 50µg/ml das lectinas DVir, DViol, ConBr, e PP foram eficientes para inibir a invasão dos esporozoítos de *E. tenella* às células primárias de embrião de galinha cultivadas, tendo sido observada influência do tempo de incubação somente para DVir, que atuou somente com 30 minutos de incubação.
  - O efeito de inibição à invasão dos esporozoítos de *E. acervulina* e *E. tenella* tratados com a lectina DViol foi semelhante na ausência ou presença do monossacarídeo D-manose, principal açúcar de especificidade das lectinas testadas.
  - O efeito inibitório de invasão mostrou-se esporozoíto-específico, uma vez que os tratamentos das células primárias de embrião de galinha com as lectinas, não alteraram o processo de invasão.
  - As lectinas de planta da família Diocleinae testadas alteraram o processo de invasão celular dos esporozoítos de *E. acervulina* e *E. tenella* sem, no entanto desempenhar uma atividade parasiticida.
-

As lectinas Diocleinae que apresentaram capacidade estimulatória do sistema imune de mamíferos *in vitro* e *in vivo* em diversos trabalhos publicados, mostraram no presente trabalho, marcante efeito inibitório sobre as formas invasivas - esporozoítos de *E. acervulina* e *E. tenella*. Essas características ressaltam o potencial de estudo das lectinas Diocleinae como novas formas de controle da coccidiose aviária.

---



## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALROY, J.; GOYAL, V.; LUKACS, N.; TAYLOR JR, R.; STROUT, R.; WARD, W. & PEREIRA, M. (1989) Glyconjugates of the epithelium of the domestic fowl (*Gallus domesticus*): a lectin histochemistry study. *Histochemical Journal*, **21**: 187-193.
- AUGUSTINE, P.C. (1985) *Eimeria meleagrimitis* sporozoites: Effect of lectins on invasion of culture cells. *Poultry Science*, **64**: 2296 – 2299.
- ; SMITH, C.K.; DANFORTH, H.D. & RUFF, M.B. (1987). Effects of ionophorous anticoccidials on invasion and development of *Eimeria*: comparison of sensitive and resistant isolates and correlation with drug uptake. *Poultry Science*, **71**: 970 – 978.
- . (2001) Cell: sporozoite interactions and invasion by apicomplexan parasites of the genus *Eimeria*. *International Journal for Parasitology*, **31**: 1-8.
- BABA, E.; UNO, H.; SADANO, N.; FUKARTA, T.; SASAI, K. & ARAKAWA, A. (1996) *Eimeria tenella*: role of carbohydrates on sporozoite at the penetration into cultured cells. *Experimental Parasitology*, **83**: 67 – 72.
- BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T.B.; FREITAS, L.A.R. & BARRAL-NETO, M. (2001) *In vivo* activation and apoptosis by lectins of Diocleinae subtribe. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **96(5)**: 673-678.
- BARRAL-NETO, M.; SANTOS, S.B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L.I.M.; SANTOS, C.F.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A. & CAVADA, B.S. (1992) Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the *Dioclea* tribe. *Immunology Investigations*, **21**: 297-303.
- BENTO, C.A.M.; CAVADA, B.S.; OLIVEIRA, J.T.A.; MOREIRA, R.A. & BARJA-FIDALGO, C. (1993). Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. *Agents Actions*, **38**: 48-54.
- BROEKAERT, W.F. & PEUMANS, W.J. (1986) Lectins release from seeds of *Datura stramonium* and interference of the *Datura stramonium* lectin with bacterial motility.
-

In: *Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, ed. T.C. Bog-Hansen & E. Van Driessche, **5**: 57 – 65.

CALVETTE, J.J., THOLE, H.H., RAIDA, M., URBANKE, C., ROMERO, A., GRANGEIRO, T.B., RAMOS, M.V., ROCHA, I.M.A., GUIMARÃES, F.N., CAVADA, B.S. (1999) Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1430**: 367 - 375.

CASTLE, M.D. JENKINS, M.C. DANFORTH, H.D. & LILLIHOJ, H.S. (1991) Characterization of a recombinant *Eimeria acervulina* antigen expressed in sporozoite and merozoite developmental stages. *Journal of Parasitology*, **77**: 384 – 390.

CASTRO, A.G.M. (1994) A situação da coccidiose no Brasil: Importância Econômica. *Simpósio Internacional sobre Coccidiose*, Santos – SP, Brasil, pp: 45 – 54.

CHAPMAN, H.D. (1978) Studies of the excystation of different species of *Eimeria in vitro*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, **56**: 115 – 121.

----- . (1989) Sensitivity of field isolates of *Eimeria tenella* to anticoccidial drugs in the chicken. *Research in Veterinary Science*, **47**:125 – 128.

----- & SHIRLEY, M.W.(1989) Sensitivity of field isolates of *Eimeria* species to monensin and lasalocid in the chicken. *Research in Veterinary Science*, **46**: 114 – 117.

----- . (1993) Resistance to anticoccidial drugs in fowl. *Parasitology Today*, **9**: 159 – 162.

----- . (1994) Sensitivity of field isolates of *Eimeria* to monensin following the use of a coccidiosis vaccine in broiler chickens. *Poultry Science*, **73**: 476 – 478.

----- & CHERRY, T.E. (1997) Eyespray vaccination: infectivity and development of immunity to *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella*-J. *Appl. Poultry Res*, **6**: 274 – 278.

---

- , SANDSTROM, J. & BREEDING, S.W. (1998) Effect of the anticoccidial agents halofuginone and monensin when given with growth promoting antibiotics upon the control of coccidiosis in the turkey. *Avian Pathology*, **27**: 498 – 504.
- CRANE, M.S.J. & DVORAK, J. (1982) Influence of mono-saccharides on the infection of vertebrate cells by *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **5**: 333.
- CURRENT, W.L., UPTON, S.J. & LONG, P.L. (1990) Taxonomy and life cycle. In: *Coccidiosis of man and domestic animals*. P.L. Long Ed. CRC Press. Boca Raton, Florida, **pp**: 1 – 16.
- DAM, T.K., CAVADA, B.S., GRANGEIRO, T.B., SANTOS, C.F., SOUSA, F.A.M., OSCARSON, S. & BREWER, C.F. (1998). Diocleinae lectins are a group of proteins with conserved binding sites for the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides and differential specificities for the complex carbohydrates. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**: 12082 - 12088.
- DANFORTH, D.H. & MCANDREW, S.J. (1987) Hybridoma antibody characterization on stage-specific and stage-cross-reactive antigens of *Eimeria tenella*. *Journal for Parasitology*, **73**: 985 – 992.
- . (1999) Mecanismos de resistência às drogas anticoccidianas. *II Simpósio Internacional sobre Coccidiose Aviária*, Foz do Iguaçu – PR, Brasil, **pp**: 45 – 51.
- DORAN, D.J. (1971) Increasing the yield of *Eimeria tenella* oocysts in cell culture. *Journal for Parasitology*, **57**: 891 – 899.
- FARTHING, M.J.G., PEREIRA, M.E.A. & KEUSCH, G.T. (1986) Description and characterization of surface lectin of *Giardia lamblia*-*Infection and Immunity*, **51**:661-667.
- FACTA(2001): Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. Disponível em: <http://www.facta.org>.
- FERREIRA, R.R., CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T., GOMES, J.C. (1996) Characteristics of the histamine release from hamster cheek pouch mast cells
-

stimulated by lectins from Brazilian beans and concanavalin A. *Inflammatory Research*, **45**:442-447.

FRIEDMAN, Y., WEISSMAN, Y., AVIDAR, Y. & BOGIN, E.(1998) The toxic effects of monensin and chloramphenicol on laying turkey breeder hens. *Avian Pathology*, **27**: 205 – 208.

GOODWIN, M.A., BROWN, J. & BOUNUS, D.I. (1998) Use of microscopic lesion scores, gross lesion scores and oocyst count scores to detect *Eimeria maxima* in chickens -*Avian Pathology*, **27**: 405 – 408.

GOMES, J.C., FERREIRA, R.R., CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T. (1994) Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with concanavalin A. *Agents Actions*, **41**:132-135.

GRANGEIRO, T.B., SCHRIEFER, A., CALVETTE, J.J., RAIDA, M., URBANKE, C., BARRAL-NETO, M. & CAVADA, B.S.(1997) Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. *Eur J Biochem*, **248(1)**:43-48.

GRUBER, A. (1999) Recentes avanços na Biologia Molecular de protozoários do gênero *Eimeria*. *II Simpósio Internacional sobre Coccidiose Aviária*, Foz do Iguaçu – PR, Brasil, **pp**: 9 – 21.

GUENTHER, B. (2001) Current status of flow cytometry in cell and molecular biology. *International Review of Cytology*, **204**:239-298.

GUPTA, D.; OSCARSON, S.; RAJU, T.S.; STANLEY, P.; TOONE, E.J. & BREWER, C.F. (1996) A comparison of the fine saccharide-binding specificity of *Dioclea grandiflora* lectin and Concanavalin A. *European Journal of Biochemistry*, **242(2)**: 320-326.

GUPTA, S.K., SCHULMAN, S. & VANDERBERG, J.P. (1985) Stage-dependent toxicity of *N*-acetyl-glucosamine to *Plasmodium falciparum*. *Journal of Protozoology*, **32**: 91 – 95.

---

- GURNETT, A., DULSKI, P., HSU, J. & TURNER, M.J. (1990) A family of glycolipid linked proteins in *Eimeria tenella*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **41**: 177 – 186.
- HOFMANN, J. & RAETHER, W. (1990) Improved techniques for the *in vitro* cultivation of *Eimeria tenella* in primary chick kidney cells. *Parasitology Research*, **76**: 479 – 486.
- HORTON-SMITH, C. (1951) Sect. III, 9<sup>th</sup> Wlds Poult. Congr., Paris, pp: 3 – 8.
- JENKINS, M.C., CASTLE, M.D. & DANFORTH, H.D. (1991) Protective immunization against the intestinal parasite *Eimeria acervulina* with recombinant coccidial antigen. *Poultry Science*, **70**: 353 – 362.
- JUNGERY, M., PASUOL, G., NEWBOLD, C.I. & WEATHERALL, D.J. (1983) A lectin-like receptor is involved in invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*. *Proceedures of the National Academy Sciences, USA*, **80**: 1018 – 1022.
- KAWAZOE, U., CHAPMAN, H.D. & SHAW, M. (1991) Sensitivity of field isolates of *Eimeria acervulina* to salinomycin, maduramicin, and a mixture of colpidol and methyl benzoquate in the chicken. *Avian Pathology*, **20**: 439 – 446.
- ., TOMLEY, F.M. & FRASIER, J.A. (1992) Fracionation and antigenic characterization of organelles of *Eimeria tenella* sporozoites. *Parasitology*, **104**: 1 – 9
- . (1994) *Biologia-Simpósio Internacional dobre Coccidiose*, Santos – SP, Brasil, pp: 1 – 6.
- . & DIFABIO, J. (1994) Resistance to diclazuril in field isolates of *Eimeria* species obtained from comercial broiler flocks in Brazil. *Avian Pathology*, **23**: 305 – 311.
- . & MANARINI, C.A.L. (2001) Development and characterization of *Eimeria acervulina* brazilian precocious strain. **In**: *VIIth international Coccidiosis Conference and Annual Scientific Meeting of the Australian Society for Parasitology*. Ed. Ellis, J.T.; Johnson, A.M.; Morrison, D.A.; Smith, N.C., Australia.
-

- KILPATRICK, D.C.(1991) Lectin interactions with human leukocytes: mitogenicity, cell separation, clinical applications. In: *Lectins Reviews*, ed. D.C. Kilpatrick, E. Van Driessche & T.C. BOG-HANSEN, **1**: 69 – 80.
- KOBILER, D. & MIRELMAN, D. (1980) Lectin activity in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infection and Immunity*, **29**: 221 – 225.
- KÖHLER, S., DELWICHE, C.F. DENNY, P.W., TILNEY, L.G., WEBSTER, P., WILSON, R.J.M., PALMER, J.D. & ROOS, D.S. (1997) A plastid of probable green algal origin in Apicomplexam parasites. *Science*, **275**: 1485 – 1489.
- LEV, B.I., WARD, H.D., KEUSCH, G.T. & PEREIRA, M.E.A. (1986) Lectin activity in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infection and Immunity*, **29**: 221 – 225.
- LILLEY, C.J., DEVLIN, P., URWIN, P.E. & ATKINSON, S.J. (1999) Parasitic Nematodes, Proteinases and Transgenic Plants. *Parasitology Today*, **15**: 414 – 417.
- LONG, P.L. & ROSE, M.E. (1972) Immunity to coccidiosis: effect of serum antibodies on cell invasion by sporozoites of *Eimeria in vitro*. *Parasitology*, **65**: 437 – 445.
- ., MILLARD, B.J., JOYNER, L.P. & NORTON, C.C. (1976) A guide to laboratories techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. *Folia Vet. Lat.*, **6**: 201 – 217.
- . (1987) Coccidiosis in poultry. *CRC Critical Rev*, **1**: 25 – 50.
- MANN, K., FARIAS, C.M., DEL SOL, F.G., SANTOS, C.F., GRANGEIRO, T.B., NAGANO, C.S., CAVADA, B.S. & CALVETTE, J.J. (2001) The amino-acid sequence of the glucose/mannose-specific lectin isolated form *Parkia platycephala* seeds reveals three tandemly arranged jacalin-relates domains. *European Journal of Biochemistry*, **268**: 4414 – 4422.
- MARTIN, A., DANFORTH, H.D. & JAYNES, J.M. (1999) Evaluation of the effect of peptydil membrane-interactive molecules on avian coccidia. *Parasitology Research*, **85**: 331 – 336.
-

- McDONALD, V., BALLINGALL, S. & SHIRLEY, M.W. (1982) A preliminary study of the nature of infection and immunity in chickens given an attenuated line of *Eimeria acervulina*. *Parasitology*, **84**: 21-30.
- & BALLINGALL, S.(1983) Attenuation of *Eimeria mivati* by selection for precocious development. *Parasitology*, **86**: 371 – 379.
- , SHIRLEY, M.W. & MILLARD, B.J. (1986) A comparative study of two lines of *Eimeria tenella* attenuated either by selection for precocious development in the chicken or by growth in chicken embryos. *Avian Pathology*, **15**: 323 – 335.
- . & SHIRLEY, M.W. (1987) The endogenous development of virulent strains and attenuated precocious lines of *Eimeria tenella* and *E.necatrix*.*Journal for Parasitology*, **73**: 993 – 997.
- MENCHER, D., PUGATSCH, T. & WALLACH, M. (1989) Antigenic proteins of *Eimeria maxima* gametocytes: cell-free translation and detection with recovered chicken serum. *Experimental Parasitolog.* **68**: 40 – 48.
- MONTES, C., ROJO, F., HIDALGO, R., FERRE, I. & BADIOLA, C. (1998) Selection and development of a spanish precocious strain of *Eimeria necatrix*. *Veterinary Parasitology*, **78**: 169 – 183.
- OROZOCO, E., RODRIGUEZ, M.A., MURPHY, C.F., SALATA, R.A., PETRI, W.A., SMITH, R.D. & RAVDIN, J.I. (1986) *Entamoeba histolytica* cytopathogenicity and lectin activity of avirulent mutants. *Experimental Parasitology*, **63**: 157 – 165.
- PETRI, W.A., SMITH, R.D., SCHLESINGER & RAVDIN, J.I. (1986) Adherence mechanisms of *Entamoeba histolytica*, the N-acetyl-D-galactosamine inhibitable lectin. *Clinical Research*, **34**: 222A.
- PEUMANS, W.J. & VAN DAMME, E.J.M. (1995) Lectins as plants defense proteins. *Plant Physiology*, **109**: 347 – 352.
- & VAN DAMME, E.J.M. (1998) Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in Biotechnology. In: *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, **25**: 199 – 228.
-

- PUTSZTAI, A., GRANT, G., SPENCER, R.J., DUGUID, T.J., BROWN, D.S., EWEN, S.W.V., PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J.M. & BARDOCZ, S. (1993) Kidney bean lectin-induced *E. coli* overgrowth in the small intestine is blocked by GNA, a mannose-specific lectin. *Journal of Applied Bacteriology*, **75**: 360 – 368.
- RAVDIN, J.I. , MURPHY, C.F., SALATA, R.A., GUERRANT, R.L. & HEWLETT, E.L. (1985) N-acetyl-D-galactosamine inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. 1. Partial purification and relation to amoebic virulence *in vitro*. *Journal of Infectious Diseases*, **151**: 804-815.
- RAETHER. W., MEHLHORN. H., HOFMANN. J., BRAU. B., EHRLICH. K. (1991) Flow cytometric analysis of *Eimeria tenella* sporozoite populations exposed to salinomycin sodium *in vitro*: a comparative study using light and electron microscopy and an *in vitro* sporozoite invasion-inhibition test. *Parasitology Research*, **77**:386-394.
- RILEY, J.F. & WILSON, R.G. (1976) Drug screening in cell culture for the detection of anticoccidial activity, *Parasitology*. **73**: 137 – 148.
- RODRIGUEZ, D., CAVADA, B.S., ABREU-DE-OLIVEIRA, J.T., DE-AZEVEDO-MOREIRA, R. & RUSSO, M. (1992) Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. *Brasilian Journal of Medical and Biological Research*, **25**: 823-826.
- SALATA, R.A., COX, J.G. & RAVDIN, J.I. (1987) The interaction of human T-lymphocytes and *Entamoeba histolytica* killing of virulent amoebae by lectin-dependent lymphocytes. *Parasite Immunology*, **9**: 249 – 262.
- SANZ-APARICIO, J., HERMOSO, J., GRANGEIRO, T.B., CALVETTE, J.J. & CAVADA, B.S. (1997) The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. *FEBS Letters*, **405**(1): 114-118.
- SAS INSTITUTE INC. (1988). SAS/STAT *user's guide*, Release 6.03 edition. (Cary, NC, SAS Institute Inc.).
-



- SCHMATZ, D.M., CRANE, M.S.J. & MURRAY, P.K.(1984) Purification of *Eimeria* sporozoites by DE-52 anion exchange chromatography-*Journal of Protozoology*, **31**: 181 – 183.
- SHIRLEY, M.W., McDONALD, V. & BELLATTI, M.A. (1986) *Eimeria brunetti*: selection and characteristics of precocious (and attenuated) lines. *Avian Pathology*, **15**: 705 – 717.
- & BELLATTI, M.A. (1988) Live attenuated coccidiosis vaccine: selection of a second precocious line of *Eimeria maxima*. *Research in Veterinary Science*, **44**: 25 – 28.
- (1989) Enzyme characterization of the Eimeriidae. In: *Coccidia and intestinal coccidiomorphs, V<sup>th</sup> International Conference, INRA Publications, Ed. Yvoré*, pp: 111 – 124.
- (1992) Research on avian coccidia: an update. *Br. Vet. J.*, **148**: 479 – 499.
- (1994) Vacinas vivas: atenuadas e virulentas. *Simpósio Internacional sobre Coccidiose*, Santos – SP, Brasil, pp: 109 – 124.
- (1999) Uso de vacinas baseadas em oocistos vivos no controle da coccidiose aviária, Visão Européia. *II Simpósio Internacional sobre Coccidiose Aviária*, Foz do Iguaçu – PR, Brasil, pp: 57 – 70.
- SILVA Jr., A, KAWAZOE, U., FREITAS, F.T.F., GATTI, M.S.V., DOLDER, H., SCHUMACHER, R.I., JULIANO, M.A. & LEITE, A. (2001), “Avian anticoccidial activity of a membrane-interactive tryptophan-rich peptide selected from Phage Display Libraries”. *VIIIth International Coccidiosis Conference and Annual Scientific Meeting of the Australian Society for Parasitology*, Ed. Ellis, J.T.; Johnson, A.M.; Morrison, D.A.; Smith, N.C., Australia, pp: 82-83.
- STROUT, R.G., ALROY, J., LUCKACS, N.W., WARD, H.D. & PEREIRA, M.E.A.(1994) Developmentally regulated lectins in *Eimeria* species and their role in avian coccidiosis. *Journal of Parasitology*, **78**: 886 – 893.
-

SUPRASERT, A. & FUJIOKA, T. (1988) Lectin and ultrastructural biochemistry of glycoconjugates in the caecal epithelium of chicken. *Acta Histochem.* **83**: 141-151.

WALLACH, M., MENCHER, D., YARUS, S., PILLEMER, G., HALABI, A. & PUGATSCH, T. (1989) *Eimeria maxima*: identification of gametocyte proteins antigens. *Experimental Parasitology*, **68**: 46 – 49.

WECK-HEIMANN, A. (2001) Disponível em: <http://www.saxonet.de/coccidia/> .

WILLIAMS, R.B. (1998) Analysis of the phenotype in field populations of *Eimeria acervulina* expressing dual drug-resistance to decoquinate and clopidol. *Avian Pathology*, **27**: 67 – 73.