

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**EFEITOS DA VACINAÇÃO CONTRA COCCIDIOSE ASSOCIADA A  
AMINOÁCIDOS SUPLEMENTARES E VITAMINA E NO  
DESEMPENHO, FUNÇÃO IMUNOLÓGICA E MICROBIOTA DE  
FRANGOS DE CORTE**

CATIANE ORSO

Zootecnista – UFSM  
Mestre em Zootecnia – UFSM

Tese apresentada como um dos requisitos para a obtenção do grau de  
Doutor em Zootecnia Área de Concentração em Produção Animal

Porto Alegre, RS, Brasil  
Março de 2021

### CIP - Catalogação na Publicação

Orso, Catiane

EFEITOS DA VACINAÇÃO CONTRA COCCIDIOSE ASSOCIADA A AMINOÁCIDOS SUPLEMENTARES E VITAMINA E NO DESEMPENHO, FUNÇÃO IMUNOLÓGICA E MICROBIOTA DE FRANGOS DE CORTE / Catiane Orso. -- 2021.

105 f.

Orientadora: Andréa Machado Leal Ribeiro.

Coorientadora: Ana Paula Guedes Frazzon.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. frangos de corte. 2. imunidade. 3. microbiota. 4. coccidiose. I. Machado Leal Ribeiro, Andréa, orient. II. Guedes Frazzon, Ana Paula, coorient. III. Título.

Catiane Orso  
Mestre em Zootecnia

## TESE

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de  
**DOUTORA EM ZOOTECNIA**  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 26.03.21  
Pela Banca Examinadora



ANDRÉA MACHADO LEAL RIBEIRO  
PPG Zootecnia/UFRGS  
Orientadora

Homologado em: 01/06/2021  
Por



DANILO PEDRO STREIT JR.  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia



Fernando Rutz  
UFPEL



Keysuke Muramatsu  
JBS



Luciano Trevizan  
UFRGS



CARLOS ALBERTO BISSANI  
Diretor da Faculdade de Agronomia

## DEDICATÓRIA

Á Andréa Machado Leal Ribeiro, por minha  
admiração como pessoa e profissional.

Aos meus pais, Vilso e Ivanilde  
minha eterna gratidão.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e meu irmão, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. Eles me fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente. Aos meus avós, que mesmo com minha ausência devido ao tempo dedicado aos estudos, sempre entenderam e me incentivaram a buscar meus sonhos.

Meu agradecimento especial é dedicado a Profa. Andréa, que além do ensinar nos inspira a aprender, nos inspira a buscar por um mundo mais justo e abrir nossas mentes para outros horizontes. São esses os professores que deixam marca eterna em nossos corações, e que tanto contribuem para a construção profissional e pessoal. Minha eterna gratidão por tê-la encontrado em minha trajetória.

Meu muito obrigado à família Andretta e Kipper por toda ajuda e incentivo. Foram noites de jantas, cervejas e estatísticas que serão guardadas com muito carinho na memória. Além de todo o aprendizado, serei eternamente grata pela amizade construída.

Aos mais fiéis amigos, Thais, Carol, Kunh, Schroeder, Ritt e Alexandre. Vocês são parte dessa jornada e sem o apoio de vocês eu jamais teria alcançado meus objetivos. Obrigado pelos cafés de final de expediente e pela amizade eterna. Amo vocês.

Um agradecimento a todos os professores que fizeram parte dessa história. Aos meus co-orientadores, Prof Ana e Prof Jeverson Frazzon, que carinhosamente me acolheram em seus laboratórios e me deram todo o suporte para a execução deste trabalho. Minha parceira e amiga de PCR e sequenciamento Michele, foi essencial para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dilger's Lab, Prof Ryan Dilger por me ensinar tanto e contribuir na minha formação, pelo acolhimento e ajuda na realização dos meus sonhos. As minhas amigas Anne, Lidia, Paula, Fabi e Maci pela amizade construída durante um ano tão difícil como 2020. Vocês serão eternamente lembradas!

Não posso deixar de agradecer a esta universidade por ser um espaço que privilegia o conhecimento e onde todas as ideias são bem recebidas. Ao Lezo, alunos e professores, por ser um time muito competente e ser palco da construção de sonhos. Aos estagiários, Jessica, Cony, Pedro, Gustavo, Julio e Danrlei pela ajuda e apoio.

Ao meu novo time de nutrição, fizeram parte dos últimos meses dessa trajetória e estão sendo fundamentais para que eu possa finalizar essa etapa da melhor forma possível.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma fizeram parte desse sonho, meu MUITO OBRIGADA!

*“Das coisas que a sabedoria proporciona para tornar a vida inteiramente feliz, a maior de todas é uma amizade”*

(Epicuro)

## EFEITOS DA VACINAÇÃO CONTRA COCCIDIOSE ASSOCIADA A AMINOÁCIDOS SUPLEMENTARES E VITAMINA E NO DESEMPENHO, FUNÇÃO IMUNOLÓGICA E MICROBIOTA DE FRANGOS DE CORTE<sup>1</sup>

Autora: Catiane Orso

Orientadora: Andréa Machado Leal Ribeiro

Co-orientadora: Ana Paula Guedes Frazon

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar o impacto da vacinação contra coccidiose no desempenho produtivo, microbiota cecal e sistema imune de frangos de corte quando suplementados com aminoácidos e vitamina E. Frangos Cobb® machos foram alimentados com gelatina incluída a 2% para melhorar os níveis de glicina e prolina, além da adição de vitamina E (70 mg/kg de alimento). Metade das aves recebeu vacina viva administrada via água no primeiro dia, enquanto a outra metade recebeu um anticoccidiano (salinomicina) na dieta até os 35 dias de idade. Oito tratamentos foram divididos em 7 repetições (boxes), com 10 aves por box. Os resultados foram divididos em dois artigos. Artigo 1: Efeitos da vacinação e do anticoccidiano sobre a microbiota cecal dos frangos de corte. Os genes bacterianos 16S rRNA foram classificados como 3 filos principais (Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria), representando mais de 98% da comunidade bacteriana identificada. A vacina não reduziu a  $\alpha$ -diversidade e  $\beta$ -diversidade ( $P > 0.05$ ). O enriquecimento de Bacteroidetes foi relacionado ao grupo salinomicina, enquanto Firmicutes e Proteobacterias foram encontrados em maior abundância no grupo vacinado ( $P < 0.05$ ). Artigo 2: Resposta imune e desempenho zootécnico de frangos de corte vacinados contra coccidiose ou tratados com salinomicina, suplementados com aminoácidos e vitamina E. A vacinação afetou negativamente o desempenho dos animais, no entanto, a oferta aminoacídica através da gelatina e vitamina E reduziu a resposta negativa à vacina de 22 a 42 dias, mas também proporcionou benefícios às aves que receberam salinomicina. No grupo vacinado aumentou a expressão gênica de citocinas inflamatórias como IFN- $\gamma$  e IL1- $\beta$  e genes de recuperação intestinal como MUC2 e TFF2 ( $P < 0,05$ ) em comparação ao grupo salinomicina, enquanto que diminuiu a expressão de citocinas antiinflamatórias IL-10 e IL-4 ( $P < 0,05$ ). As aves vacinadas e suplementadas tiveram redução na expressão de citocinas IFN- $\gamma$  e IL1- $\beta$ , MUC2 e TFF2 ( $P < 0,05$ ) e maior expressão da citocina anti-inflamatória IL-4. A vacina não diminuiu a riqueza e diversidade de espécies, mas diminuiu a porcentagem de Bacteroidetes. O grupo vacinado também apresentou maior porcentual do filo Proteobacteria, o que pode ajudar a explicar seu pior desempenho. A vacinação pode aumentar o estado imunológico pró-inflamatório e aumentar a expressão de mucinas em comparação à adição de salinomicina na dieta e esses eventos podem estar contribuindo para o desempenho inferior observado. O uso de vitamina E e aminoácidos suplementares podem minimizar os efeitos imunológicos negativos.

<sup>1</sup> Tese de Doutorado em Zootecnia - Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (105 p.). Março, 2021.

Palavras-chave: Citocinas; Eimeria; Imunidade; Microbiota; Saúde intestinal;

## THE EFFECTS OF ANTI-COCCIDIAL VACCINATION ASSOCIATED WITH SUPPLEMENTAL AMINO ACIDS AND VITAMIN E ON THE PERFORMANCE, MICROBIOTA CECAL AND IMMUNE SYSTEM IN BROILER CHICKENS <sup>1</sup>

Author: Catiane Orso

Adviser: Andréa Machado Leal Ribeiro Co-adviser: Ana Paula Guedes Frazzon

### ABSTRACT

The objective of this study was to determine the impact of cocci-vaccine on performance and immune status in broilers when supplemented with amino acids and vitamin E. Male Cobb® chickens were fed gelatin included at 2% to improve levels of proline and glycine, and vitamin E at 70 mg per kg of diet. Half of the chicks received live vaccine against coccidiosis administered via water on the first day, while the another half received an anticoccidial (salinomycin) in the feed until 35 days of age. Eight treatments were divided into 7 repetitions with 10 birds per box. The results were divided in two manuscripts: 1: Effects of vaccination and anticoccidial on the cecal microbiota of broilers. The bacterial 16S rRNA genes were classified as 3 main phyla (Bacteroidetes, Firmicutes and Proteobacteria), representing more than 98% of the total bacterial community. The vaccine did not reduce  $\alpha$ -diversity and  $\beta$ -diversity ( $P > 0.05$ ). The salinomycin group was related to the enrichment of Bacteroidetes, while Firmicutes and Proteobacteria were found in high abundance in the vaccinated group ( $P < 0.05$ ); 2: Immune status and performance of chickens vaccinated against coccidiosis or treated with salinomycin when supplemented with amino acids and vitamin E. Vaccination affected negatively the performance of the broilers, however, the amino acid and vitamin supply reduced the negative response to the vaccine from 22 to 42 days, and also provided benefits to the broilers that received salinomycin. The vaccinated group increased the expression of inflammatory cytokines such as IFN- $\gamma$  and IL1- $\beta$  and intestinal recovery genes such as MUC2 and TFF2 ( $P < 0.05$ ) compared to the salinomycin group, while decreasing the expression of IL-10 and IL-4 anti-inflammatory cytokines ( $P < 0.05$ ). The supplemented vaccinated broilers showed a reduction in the expression of cytokines IFN- $\gamma$  and IL1- $\beta$ , MUC2 and TFF2 ( $P < 0.05$ ) and a greater expression of anti-inflammatory as IL-4. It was observed that the vaccine did not decrease the richness and diversity of the species, but decreased the percentage of Bacteroidetes. Vaccination can increase the proinflammatory immune status, increase mucin expression compared to dietary salinomycin. These events may be contributing to poor performance. Vitamin E and supplemental amino acids may minimize negative immune effects. The vaccine group also had a higher percentage of the Proteobacteria phylum, which may help explain its poorer performance.

Keywords: Cytokines; Eimeria; Immunity; Gut health; Microbiota

<sup>1</sup> Doctoral thesis in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (105 p.) March, 2021



## Lista de Tabelas

### CAPÍTULO I

**Tabela 1.** Composição nutricional da gelatina bovina utilizada no experimento.....30

**Tabela 2.** Perfil de aminoácidos da Gelatina utilizada no experimento...31

### CAPÍTULO II

**Table 1.** Nutritional composition of the experimental diets.....56

**Table 2.** Performance of broilers vaccinated for coccidiosis or supplemented with salinomycin in diets to 1 – 42 days.....58

### CAPÍTULO III

**Table 1.** Experimental treatments.....82

**Table 2.** Experimental diets with and without gelatin and Vitamin.....83

**Table 3.** Oligonucleotide primers used for quantitative reverse transcription-PCR of chicken cytokines .....84

**Table 4.** Performance of broilers vaccinated or not for coccidiosis receiving supplementation with gelatine (Gel) and vitamin E (Vit E).....85

**Table 5.** Performance of broilers vaccinated or not for coccidiosis receiving supplementation with gelatin (Gel) and vitamin E (Vit E) of 22 to 42 days.86

## Lista de Figuras

### CAPÍTULO II

- Figure 1.** Analysis of Alpha – diversity in the cecum of broiler chicken treated with salinomycin or vaccinated.....59
- Figure 2.** First two dimensions of the Detrended Correspondence Analysis (DCA) and Canonical Correspondence Analysis (CA) and the amount of variation explained are shown. Each circle represents the populations, and colors represent the groups.....59
- Figure 3.** Relative abundances at the phylum (A) and genus (B) level of the main bacteria found in the cecum of broiler chicken treated with salinomycin or vaccinated.....60
- Figure 4.** Total relationship between genus found in the cecum of broilers.....61

### CAPÍTULO III

- Figure 1.** Relationship between the reductions in feed intake and growth rate.....84
- Figure 2.** Effect of coccidiosis vaccination or in-feed salinomycin on pro-inflammatory intestinal cytokine transcript levels.....85
- Figure 3.** Effect of coccidiosis vaccination or in-feed salinomycin on T helper 1 intestinal cytokine transcript levels.....85
- Figure 4.** Effect of coccidiosis vaccination or in-feed salinomycin on T helper 2 intestinal cytokine transcript levels.....86
- Figure 5.** Effect of coccidiosis vaccination or in-feed salinomycin on intestinal mucins transcript levels.....86
- Figure 6.** Effect of coccidiosis vaccination or in-feed salinomycin on intestinal gens transcript levels.....87

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

APCs: células apresentadora de antígenos  
DNA: ácido desoxirribonucleico  
BWG: Body weight gain  
ADFI: Feed intake  
IFN- $\gamma$ : interferon-gama IL: interleucina  
MHC: complexo de histocompatibilidade  
mRNA: RNA mensageiro; RNA: ácido ribonucleico  
NF- $\kappa$ B: fator de transcrição nuclear kappa-beta  
NK: células natural killers  
RT-qPCR: real time quantitative polymerase chain reaction  
PAMP: padrões moleculares associados a patógenos RNA: ácido ribonucleico  
Th: linfócito T *helper*  
TLR: receptores *toll-like*  
TNF: fator de necrose tumoral  
 $\Delta$ BW: variação no ganho de peso entre os tratamentos vacinados e com anticoccidianos  
 $\Delta$ FI: variação no consumo de ração entre entre os tratamentos vacinados e com anticoccidianos  
TLRs: receptores do tipo Toll-like  
PRRs: receptores de reconhecimento padrão  
TFF2: trefoil family factor-2  
CD36: cluster de diferenciação 36

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>13</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1 Coccidiose aviária</b> .....	16
<b>2.2 Métodos de controle da coccidiose</b> .....	17
<b>2.3 Sistema imunológico</b> .....	20
2.3.1 Órgãos do sistema imune.....	20
2.3.2 Células do sistema imune .....	21
2.3.3 Desencadeamento da resposta imunológica .....	23
2.3.4 Imunidade de mucosas .....	26
<b>2.3 Efeitos da coccidiose sobre requisitos nutricionais, metabolismo intestinal e microbiota</b> .....	29
<b>2.4 Gelatina</b> .....	31
<b>2.5 Vitamina E</b> .....	34
<b>3. HIPÓTESES E OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1 Hipóteses</b> .....	37
<b>3.2 Objetivos</b> .....	<b>37</b>
3.2.1 Geral .....	37
3.2.2. Específicos .....	37
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>38</b>
<b>Changes in the ceca microbiota of broilers vaccinated for coccidiosis or supplemented with salinomycin</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>INTRODUCTION</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>MATERIAL AND METHODS</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	Erro! Indicador não definido.
<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>65</b>
<b>Effect of the live Eimeria vaccination or salinomycin on growth and immune status in broiler chickens received inclusion in-feed gelatin and vitamin E</b> .....	66
<b>INTRODUCTION</b> .....	68
<b>MATERIAL AND METHODS</b> .....	69
<b>RESULTS</b> .....	73
<b>DISCUSSION</b> .....	75
<b>REFERENCES</b> .....	81
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>94</b>

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>96</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>104</b>
<b>APÊNDICE A - Condições ambientais durante o período experimental.....</b>	<b>104</b>

## **CAPÍTULO I**

## 1. INTRODUÇÃO

A interação entre a nutrição, imunidade e microbiota tem ganhado espaço devido às recentes normas que vem impossibilitando o uso de diversos quimioterápicos na nutrição animal. A nutrição como ferramenta para modular o sistema imunológico, tem se tornado fato real, não apenas em estados patológicos, como também para a manutenção de estados saudáveis.

A coccidiose aviária é uma doença intestinal causada por protozoários do gênero *Eimeria spp.* que se multiplicam no intestino causando destruição tecidual, prejudicando a digestão e absorção de nutrientes resultando em diarreia (Berchieri Jr. et al., 2009). A vacinação para controle da coccidiose, pode ser uma alternativa ao uso de anticoccidianos e embora estudos tenham provado a efetividade da vacinação (Lee et al., 2009), existe uma relutância generalizada em usá-la em frangos de corte. O principal motivo para esta aversão são relatos de menor desempenho, ganho de peso reduzido e menor eficiência alimentar em comparação a aves que recebem anticoccidianos na ração (Williams, 2002, Lee et al., 2011a).

Varios são os fatores fisiológicos e metabólicos desencadeados pela vacinação que podem influenciar o desempenho animal e compreendê-los é muito importante para que, através da nutrição possamos minimizar esse impacto. A mucosa intestinal em resposta à vacinação aumenta produção de mucina (Miller e Narva, 1979) a qual é composta por aminoácidos não essenciais como glicina e prolina (Moran, 2008). Nem sempre em situações de desafio é possível sintetizar esses

nutrientes na velocidade que são requeridos. A gelatina é um ingrediente que possui um conteúdo substancial de aminoácidos não-essenciais (Boomgaardt e Baker, 1972) e desta forma, pode servir como ingrediente alternativo para fornecer os aminoácidos requeridos em maiores quantidades durante o desafio vacinal. A vacinação também pode causar um processo inflamatório que estimula a produção de mucina pela mucosa intestinal. A camada de mucina contém uma diversidade de componentes de carboidratos, com locais potencialmente anexáveis para bactérias comensais e patogênicas (Sonnenburg et al., 2005). Notavelmente, alguns patógenos como clostridium utilizam mucina como fonte de nutrientes (Adedokun et al., 2012). O aumento da mucogênese induzida pela vacina pode aumentar a proliferação da microbiota patogênica, impactando o desempenho zootécnico. Para minimizar os efeitos inflamatórios e diminuir a mucogênese, existe a possibilidade da utilização de anti-inflamatórios não esteroides, como a vitamina E (Silva et al., 2011).

Com o objetivo de fornecer uma descrição dos reflexos da vacinação sobre imunidade e microbiota foi conduzido um experimento para entender os efeitos vacinais e buscar melhores formas de recuperação do desempenho por meio de alterações dietéticas.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Coccidiose aviária

A coccidiose aviária é uma doença intestinal causada por protozoários do gênero *Eimeria* spp. que se multiplicam no intestino causando destruição tecidual e prejudicando a digestão e a absorção de nutrientes, resultando em diarreia aquosa ou hemorrágica (Berchieri Jr. et al., 2009). É uma das doenças entéricas mais investigadas, principalmente devido ao grande impacto negativo na eficiência econômica na indústria avícola. Espécies que comumente infectam aves foram descritas por Tyzzer (1929) e Levine (1942), incluindo *E. acervulina*, *E. tenella*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. maxima*, *E. necatrix* e *E. Brunetti*.

Os ciclos de vida dos parasitas *Eimeria* envolvem reprodução assexuada e sexual e ocorrem dentro e fora do hospedeiro (Yun et al., 2000). Frangos de corte são suscetíveis à infecção por coccidiose durante todo o período de criação e a infecção ocorre quando uma ave ingere um oocisto esporulado. Cada oocisto esporulado contém 4 esporocistos, cada um contendo 2 esporozoítos infecciosos (Fayer, 1980). Quando o oocisto esporulado é ingerido, a parede de camada dupla é rompida e 2 esporozoítos são liberados de cada esporocisto (Current et al., 1990). Os esporozoítos liberados, se fixam e invadem as células epiteliais intestinais, onde se desenvolvem em trofozoítos e sofrem reprodução assexuada (esquizogonia) para produzir merozoítos (Hammond, 1973; Fayer, 1980). Os merozoítos rompem a célula epitelial e continuam invadindo e danificando novas células epiteliais (Hammond, 1973; McDougald e Reid, 1991). Após a divisão assexuada, os merozoítos sofrem reprodução sexuada (gameteogonia) e se desenvolvem em microgametas (machos) e macrogametas (fêmeas) (Current et al., 1990). Os microgametas fertilizam os macrogametas, resultando em zigotos e se desenvolvendo em oocistos não esporulados, então excretados pela ave para o ambiente (McDougald e Reid, 1991). A gravidade da infecção varia em função de vários fatores, como a espécie de *Eimeria*, quantidade de oocistos ingeridos e estado imunológico da ave (McDougald e Reid, 1991).

O dano ao epitélio intestinal ocorre durante uma infecção por

coccidiose, pois os parasitas coccídios infectam, se proliferam e destroem as células. O pico de dano intestinal ocorre aproximadamente 6 dias após a infecção, causando vilosidades encurtadas e espessadas, e também aumento da profundidade da cripta (Turk, 1974; Fernando e McCraw, 1973). Impactos negativos são observados na digestão e absorção de nutrientes devido à diminuição da área de superfície de absorção (McDougald e Reid, 1991; Forder et al., 2007). A rápida renovação das células intestinais ocorre para reparar danos e manter a integridade intestinal (Fernando e McCraw, 1973), no entanto, esta rápida renovação aumenta a necessidade nutricional, pois a renovação dos enterócitos é energeticamente exigente (Fernando e McCraw, 1973).

## **2.2 Métodos de controle da coccidiose**

O uso indiscriminado de anticoccidianos tem resultado na seleção de cepas resistentes a drogas, as quais reduzem a eficácia desses produtos em uso (Li et al., 2005). Diante da atual estratégia profilática, o Conselho da União Europeia propôs a retirada progressiva dos anticoccidianos utilizados como aditivos na alimentação animal. Pelos motivos expostos, cada vez mais são retirados do mercado medicamentos para controlar a coccidiose aviária. Desta forma, existe uma necessidade de novos conceitos estratégicos para o controle da eimeriose aviária (Vermeulen et al., 2001), tornando-se necessário aprimorar a capacidade de vacinação efetiva contra esta doença.

O método mais usual usado na indústria para controle da doença é por meio de anticoccidianos adicionados à ração que podem ser ionóforos ou químicos. O modo de ação varia entre os dois produtos; os ionóforos são oriundos de processos fermentativos e rompem a membrana da célula por meio do equilíbrio osmótico. Já os anticoccidianos químicos são produzidos por síntese química e afetam a função mitocondrial e co-síntese de fatores (Chapman, 2002). O uso dos ionóforos não é permitido em sistemas livres de antibióticos porque estas substâncias exercem uma função de antibiótico. Os anticoccidianos químicos podem ser usados, porém o desenvolvimento de resistência pelos coccídios limita sua

utilização e eficácia (Chapman, 2002). Considerando esses fatos, aumentou-se o uso de vacinas na produção de frangos de corte.

Atualmente, inúmeras vacinas anticoccidianas vivas compreendendo formulações variadas de cepas virulentas ou atenuadas de uma ou mais espécies estão comercialmente disponíveis (Shirley et al., 2005). As vacinas não atenuadas ou virulentas são compostas por cepas de laboratório ou de campo e não foram modificadas conforme o modelo natural que o oocisto age sobre o epitélio intestinal. Já as vacinas atenuadas utilizam oocistos que têm uma virulência artificialmente reduzida (Dalloul e Lillehoj, 2005).

As vacinas são constituídas de um pool de *Eimeria*, tipicamente *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mivati* e *E. tenella*, e são projetadas para serem pulverizadas, ingeridas pela ave via água ou injetadas *in ovo* (Tellez et al., 2014). É importante a presença de todas as espécies de *Eimeria* na composição da vacina, pelo fato que a imunidade não é cruzada entre as diferentes espécies do gênero. Para induzir imunidade através da vacinação, é necessário a reciclagem de oocistos na cama do galpão. Essa reciclagem permite que ocorra várias reinfecções considerando a eliminação e a ingestão de oocistos o que permite que a ave desenvolva a imunidade (Williams, 2002). As vacinas que são utilizadas em frangos de corte são compostas pelas espécies de *E. Acervulina*, *E. Maxima* e *E. tenella*.

A vantagem das vacinas atenuadas consiste na menor possibilidade de lesão intestinal, devido ao seu menor potencial reprodutivo (Tomasi, 2006). Porém, apesar da promoção da imunidade, existe a possibilidade de reversão da atenuação e desenvolvimento de lesões mais intensas, que podem acarretar em perda de peso. As vacinas vivas atenuadas contra coccidiose oferecem uma vantagem significativa em termos de segurança em relação às vacinas vivas virulentas. São consideradas de segunda geração e, possuem um mercado crescente desde o seu lançamento, porém seu uso é inferior ao da vacina de cepas virulentas (Lillehoj et al., 2000).

Vários estudos relataram a geração de imunidade pela vacina contra coccidiose (Brake et al., 1997; Shirley et al., 2005; Lee et al.,

2011a). Porém, ainda existe uma relutância generalizada em utilizá-la. A justificativa para essa aversão são relatos de reduções no crescimento e na eficiência alimentar (Lehman et al., 2009, Lee et al., 2011a). O desempenho reduzido como consequência das vacinas está associado a infecções leves (Lee et al., 2011a) que poderiam resultar em área de superfície absorvente reduzida (Lehman et al., 2009) e menor absorção de nutrientes e inflamação. O efeito pirogênico da vacina (febre) faz com que ocorra um aumento de 10 a 15% na taxa metabólica basal para cada 1°C de elevação de temperatura corporal. Essas mudanças metabólicas, mediadas pelas citocinas, fazem com que a glicose e aminoácidos sejam mobilizados dos tecidos periféricos e direcionada para os sítios de geração da resposta imune (Fernandes et al., 2013).

A recuperação e o ganho compensatório não são atingidos, devido ao tempo relativamente curto de criação, insuficiente em alguns casos para compensar a perda inicial, antes do abate (Williams, 1998; Lehman et al., 2009; Williams, 2010). Lehman et al., (2009) relatou que frangos de corte medicados tem maiores pesos corporais em comparação com aves vacinadas durante as primeiras 3 semanas. Um menor ganho de peso foi observado na primeira semana em frangos de corte vacinados contra coccidiose e os autores atribuíram ao aumento da demanda de nutrientes para manter a homeostase, frente ao desafio imunológico e reparação da mucosa agredida pela replicação das eimerias (Fernandes et al., 2013).

Lesões leves, pontuadas 1 ou 2 na escala de Johnson e Reid (1970), são vistas em aves vacinadas sob condições comerciais. O trabalho de Williams e Andrews (2001) mostrou que num grupo de frangos de corte saudáveis, isolado de infecções externas, monitorado diariamente, as lesões induzidas pela vacina ocorreram aleatoriamente de 5 dias até 23 dias após a vacinação. Tanto vacinas virulentas, quanto vacinas atenuadas podem dar origem a lesões leves como resultado da vacinação. Independentemente do tipo de vacina viva utilizada, para que ocorra o processo de produção de imunidade contra coccidiose, faz-se necessário que os protozoários completem ciclos no epitélio intestinal, gerando um processo inflamatório nos enterócitos (Tomasi, 2006).

De acordo com Maiorka et al. (2003), animais com uma maior renovação celular da mucosa do intestino têm criptas mais profundas como resultado da alta atividade mitótica e hiperplasia. McBride e Kelly (1990) estimaram que a manutenção do epitélio intestinal e estruturas anexas de suporte têm custo de 20% da energia bruta consumida pelo animal. Portanto, a agressão à mucosa intestinal exerce grande influência sobre a homeostase metabólica e a produtividade das aves.

Os estudos que avaliaram a eficácia da vacina e os reflexos sobre o desempenho zootécnico relatam uma perda maior nos primeiros 21 dias de vida dos animais. Parker et al. (2007) observou que frangos reduziram o consumo de ração e conseqüentemente o ganho de peso aos 17 dias de vida comparado à utilização de anticoccidianos. No entanto, Lehman et al. (2009) continuaram a observar reflexos negativos da vacinação sobre conversão alimentar e ganho de peso até a oitava semana. Pode-se pensar que ao longo dos anos as cepas de *Eimeria* se tornaram mais resistentes às drogas e o melhoramento genético, voltado para a maior produção, tornou a ave mais susceptível. Um trabalho mais antigo (Mathis, 1999) observou um menor ganho de peso corporal e pior conversão durante as primeiras 3 semanas, porém observou que as aves tiveram um ganho de peso compensatório, diminuindo quaisquer perdas iniciais, na fase final de criação de 35-42 dias de idade.

## **2.3 Sistema imunológico**

### **2.3.1 Órgãos do sistema imune**

O sistema imune é o responsável por formar e desencadear mecanismos que protegem o organismo contra o ataque de patógenos ou agente nocivos. É composto por dois grupos de órgãos, os órgãos imunitários primários e secundários. Os órgãos primários são o timo e bolsa cloacal, responsáveis pela diferenciação das células do sistema imune. O timo é responsável pelo desenvolvimento e diferenciação dos linfócitos T. A Bursa de Fabrício, exclusiva das aves, é aonde ocorre o amadurecimento e diferenciação dos linfócitos B. Já os órgãos secundários são compostos pelas glândulas de Harder, baço,

tonsilas cecais e placas de Peyer. Estes são responsáveis pelo agrupamento das células, formando sítios de amadurecimento e atuação.

É nos órgãos e tecidos linfóides secundários que se desenvolve a resposta imune humoral. Nestes locais os antígenos são capturados e processados por células apresentadoras de antígeno (APCs) e apresentados ao sistema imune adaptativo. São nestas estruturas que os linfócitos T ativados, após o reconhecimento do antígeno na superfície de uma APC, estimulam a diferenciação dos linfócitos B em células produtoras de anticorpos (Campbell, 2004; Erf, 2008).

Diferentemente dos mamíferos, os linfonodos estão ausentes nas aves. Assim, a defesa das mucosas ocorre devido a tecidos linfóides altamente especializados, como o GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissues), BALT (Bronquial Associated Lymphoid Tissues) e CALT (Conjuntiva Associated Lymphoid Tissues). Uma vez que os parasitas de *Eimeria* invadem o intestino, as respostas imunes são coordenadas principalmente pelo tecido linfóide associado ao intestino (GALT), que é composto pela camada mucosa, bursa de Fabricius e tecido linfóide agregado no divertículo de Meckel, placas de Peyer e tonsilas cecais (Yun et al., 2000).

### **2.3.2 Células do sistema imune**

O sistema imunológico conta com uma rede de células que através do contato direto ou pela secreção de citocinas, fazem os fagócitos comunicarem-se com outras células, promovendo ou regulando as respostas imunes (Abbas, 2017). Os macrófagos desempenham um papel importante da defesa inata das aves, atuando imediatamente quando um microrganismo invade o hospedeiro e também como célula efetora durante a fase tardia na imunidade adquirida. Após uma exposição a coccídios, a imunidade inata está associada à fase inicial da infecção, enquanto a imunidade adquirida segue uma infecção secundária, pois leva mais tempo para iniciar devido a uma resposta específica ao patógeno invasor (Lillehoj et al., 2007).

Na imunidade, os macrófagos apresentam funções antimicrobianas, fagocíticas e antitumorais e agem como células

regulatórias através da produção de citocinas e outros metabólitos, que podem estimular o desenvolvimento de outras células do sistema imune (Jeurissen e Janse, 1994; Qureshi et al., 2000). Os heterófilos são células semelhantes aos neutrófilos dos mamíferos (Macari et al., 2002; Campbell, 2004). Os heterófilos são as primeiras células a migrarem para o sítio inflamatório e além de realizarem fagocitose, também produzem citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL- 6 e IL- 8.

A resposta imune adaptativa pode ser subdividida em resposta imune humoral e em resposta imune celular. A resposta humoral tem como moléculas efetoras os anticorpos e é em parte, dependente dos linfócitos T auxiliares (CD4<sup>+</sup>), especificamente a população de células efetoras auxiliares do tipo 2 (*T helper 2*, Th2). Esta resposta é mais eficiente na eliminação de microrganismos extracelulares (Erf, 2008). A imunidade celular é dirigida contra patógenos intracelulares (vírus, bactérias e parasitas intracelulares como a *Eimeria*). Esta resposta é dependente de linfócitos T CD4<sup>+</sup> da sub-população efetora auxiliares do tipo 1 (*T helper 1*, Th1), linfócitos T CD8<sup>+</sup> (citotóxico) e células *Natural Killer* (NK) (Erf, 2008; Fellah et al., 2008).

Nas aves, existem apenas três classes de anticorpos: IgY, IgM e IgA (Qureshi et al., 1998; Chacana et al., 2004; Erf, 2008; Magor et al., 2013). As IgM são imunoglobulinas de fase aguda, produzidas durante a resposta imune primária e expressas também na forma de receptores de membrana plasmática dos linfócitos B. A IgY é análoga da IgG e IgE dos mamíferos, estando predominantemente presente no soro, e é responsável pela defesa contra infecções sistêmicas e pelas reações anafiláticas em aves (Macari et al., 2002.).

As IgAs são as imunoglobulinas predominantemente produzidas pelos plasmócitos presentes nas placas de Peyer e nos MALTs presentes nas tonsilas cecais (Kumar et al., 2009). A IgA envolve a proteção da superfície da mucosa (Woof et al., 2006), é o anticorpo primário nas secreções da mucosa e anticorpos IgA específicos contra parasita foram detectados na circulação após infecção por coccidiose (Lillehoj e Trout, 1996; Yun et al., 2000).

A produção de anticorpos é dependente da natureza dos

antígenos. Os anticorpos circulantes (imunidade humoral) têm capacidade mínima para limitar uma infecção por coccídios e, portanto, as respostas imunes mediadas por células são as mais eficazes durante uma infecção por coccídios (Lillehoj e Trout, 1996; Allen e Fetterer, 2002).

### 2.3.3 Desencadeamento da resposta imunológica

A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra infecções (Abbas, 2017). A resposta imune inata é composta pelas células de defesa como os macrófagos, células dendríticas, *Natural Killer*, heterófilos, enzimas, proteínas e peptídeos. As células imune inatas são as primeiras a responder e são mais versáteis devido ao grande repertório de receptores de superfície (Hamon e Quitin, 2016).

Nas células imune existem estruturas que fazem o reconhecimento do antígeno, os receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Os principais receptores são do tipo Toll-like (TLRs), lectina do tipo C, RIG-1 e receptores NOD (Hamon e Quitin, 2016). Esses receptores estão presentes nas membranas ou nos compartimentos endolisossomial de células eucarióticas de organismos multicelulares (Keestra et al., 2013). Os TLRs dos endossomos reconhecem patógenos extracelulares, enquanto que, os RIG e NOD localizados nas membranas citoplasmáticas, são importantes para o reconhecimento de vírus (Abbas, 2017). Os PRRs reconhecem moléculas específicas chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que incluem glucanos da parede celular, ácidos nucleicos, fímbrias e flagelos. Quando o antígeno se liga aos receptores da célula do hospedeiro, iniciam-se as sinalizações que desencadeia a transcrição do NF- $\kappa$ B (fator de transcrição nuclear kappa-beta) pela célula, que direciona a expressão de mediadores químicos pró-inflamatórios, como as citocinas (Santin et al., 2017).

O reconhecimento de padrões moleculares desencadeia a síntese de citocinas e a fagocitose, essenciais para induzir uma resposta inflamatória. A inflamação é induzida pelas citocinas pró-inflamatórias liberadas pelas células reconhecedoras de antígenos. Dentre as citocinas podemos citar o fator necrótico tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-12. O TNF- $\alpha$  é secretado em respostas inflamatórias da fase aguda inicial



(Kim et al., 2008). Logo após ocorre o recrutamento de monócitos e heterófilos da corrente sanguínea (Hamon e Quitin, 2016). A fagocitose induz a um metabolismo oxidativo conhecido como explosão respiratória e que resulta na produção de uma série de substâncias como peróxido de hidrogênio e radicais de hidrogênio que resultam na morte do microrganismo (Fairbrother et al., 2004). Os efeitos relativos da vacinação contra a coccidiose nos níveis séricos de óxido nítrico e anticorpos específicos e nos níveis intestinais da transcrição das citocinas, refletem um estado inflamatório (Lee et al., 2013). O óxido nítrico é produzido por monócitos e macrófagos após exposição a patógenos entéricos, como *Salmonella*, *Clostridium* e *Eimeria* (Lillehoj e Li, 2004; Babu et al., 2006; Li et al., 2010).

Os neutrófilos (heterófilos) são a população mais abundante e são os primeiros a responder à lesão inflamatória; sua migração para o local é induzida por citocinas (IL-8) (Abbas, 2017). Estes neutrófilos fagocitam os patógenos e liberam mediadores que contribuem na resposta inflamatória, sendo os mais importantes as citocinas que atraem os macrófagos para o local de inflamação. Os heterófilos agem no sítio de atuação entre 6h a 12 horas após a infecção (Harmon, 1998). Os macrófagos, ao serem ativados, apresentam fagocitose aumentada e liberação aumentada de mediadores (prostaglandinas e leucotrienos) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ). Os macrófagos e células dendríticas são detectados após 48 horas da infecção (Harmon, 1998). São as citocinas produzidas pelos macrófagos que atraem os leucócitos para o sítio de atuação. Nessa fase de inflamação a ave diminui o consumo de alimento e ganho de peso. Esses resultados estão correlacionados com o aumento das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-12) no fígado, que sugerem que as citocinas pró-inflamatórias, desencadeiam mecanismo hormonal inverso no centro da fome (Santin et al., 2017).

A fagocitose e a apresentação do antígeno interligam a resposta imune inata à resposta imune adaptativa (Scott, 2004; Abbas et al., 2017). A primeira estimula a segunda por meio da captura do antígeno por células especializadas, como as células APCs que apresentam peptídeos antigênicos aos linfócitos T, via moléculas de

histocompatibilidade principal de classe II (MHC II), e estimulam diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos produtores de anticorpos (Erf,2008; Juul-Madsen et al., 2008; Abbas et al., 2017).

Após a captura e processamento do antígeno pelas APCs, estas células expressam as moléculas de MHC de classe II associadas ao antígeno e as apresentam aos linfócitos T, resultando na liberação de citocinas e ativação da resposta imune (Kenneth, 2004; Erf, 2008; Abbas et al., 2017). Na resposta imune celular, os linfócitos T se dividem em CD4+, cuja função é ativar outras células e CD8+, células citotóxicas. Durante o reconhecimento antigênico, as células CD4+ reconhecem antígenos apresentados pelo pelos receptores MHC II, e células CD8+ reconhecem pelos MHC I. As células CD8+ são importantes para a defesa de patógenos intracelulares. Quando encontram uma APCs ligado aos receptores de classe I, as células CD8+ se ligam e direcionam o aparelho secretor à célula alvo, causando apoptose (Santin et al., 2017). Sua ação focalizada à célula infectada não permite causar danos ao tecido (Keneth et al., 2010).

As células CD4+ também são denominadas células T auxiliares (*T helper*), sendo *T helper 1* as células que ativam os macrófagos e também estimulam as células B a produzir anticorpos para a resposta imune humoral. As células *T helper 2* atuam na resposta a parasitas e ajudam na produção de anticorpos. As células T reguladoras (*T reg*) têm função de suprimir as respostas das células T e estão envolvidas na tolerância imunológica. As células *T reg* possuem expressão CD4+ e CD25+ na sua superfície e produzem altos níveis de TGFβ e IL-10 que são potentes mediadores com atividade anti-inflamatória. As atividades imunossupressoras das *T reg* ocorrem pelo contato com células efetoras T ou mediada pelas citocinas TGFβ e IL-10. As células *T reg* são ativadas pelos TLR, quando ocorre infecção são ativadas e inibidas quando diminui a concentração de patógenos (Santin et al.,2017).

Linfócitos Th1 estimulam as células T CD8+, células NK e macrófagos, enquanto os linfócitos Th2 estimulam os heterofilos e linfócitos B a agirem sobre os patógenos (Kaiser, 2010). As células B se diferenciam em plasmócitos e secretam anticorpos que é a principal

função destas células na imunidade específica. As citocinas que estimulam a resposta imune humoral são IL-4, IL-5, IL-10 e o fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Scott, 2004).

Em aves a IL-6 é responsável pela diferenciação das células B em plasmócitos secretores de anticorpos (Ratcliffe, 2002). Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> (T *helper* 2) dão origem à produção de citocinas IL-4 e IL-6, enquanto que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> (T *helper* 1) produzem IL-2 e IFN- $\gamma$ . A citocina IL-4 é conhecida como citocina anti-inflamatória e desempenha um papel significativo na supressão de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e IFN- $\gamma$  (Jolly, 2004).

A Interleucina-2 (IL-2), uma citocina que é ativada por antígenos, atua de forma autócrina estimulando a proliferação das células T. Agem também, potencializando a morte celular por apoptose de células ativadas por antígeno. Dessa forma, a IL-2 é necessária tanto para a indução como para a regulação de respostas imune mediadas pela célula T, apresenta também a capacidade de estimular a proliferação e a diferenciação de células NK e de células B. A Interleucina-6 (IL-6) é uma citocina produzida por muitos tipos celulares, incluindo os fagócitos mononucleares, as células endoteliais e fibroblastos, atua na imunidade inata e adaptativa. O Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) é uma citocina produzida pelos linfócitos T e células NK cuja principal função é ativar os macrófagos estimulando a fagocitose e a expressão do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe II.

A infecção com protozoários de *Eimeria* regula a expressão de citocinas pró-inflamatórias, ao mesmo tempo que reduz a regulação da expressão de citocinas anti-inflamatórias (Engberg et al., 2000; Lillehoj et al., 2004, 2007; Lee et al., 2011c). Esses efeitos imunológicos humorais e celulares combinados provavelmente refletem reações do hospedeiro não apenas à vacina de coccidiose, mas também aos microrganismos infecciosos *Eimeria* (Lee et al., 2013).

#### **2.3.4 Imunidade de mucosas**

Também fazem parte da resposta imune inata as mucinas, que são proteínas extensamente glicosiladas que formam uma barreira física

viscosa, impedindo o contato entre os microrganismos e as células do trato gastrointestinal. Após a infecção, um patógeno que rompeu a barreira da mucosa provoca uma resposta imune inata, intensificando uma resposta inflamatória de citocinas para sinalizar e ativar células imunes adicionais no local da infecção.

As mucinas secretadas (MUC2, MUC5 e MUC6) formam um gel hidratado que protege as células epiteliais de revestimento do contato com microrganismos. Serve também como matriz para exposição de substâncias antimicrobianas produzidas pelas células epiteliais. Além do muco secretado, a superfície apical das células epiteliais gastrointestinais é coberta com mucinas ligadas à membrana, sendo elas: MUC1, MUC3A/b, MUC12, MUC13 e MUC17. Essas mucinas ligadas à membrana combinam-se com glicolípídeos e formam uma camada macromolecular densa (30 a 500 nm) na superfície do epitélio, chamada glicocálice (Abbas et al., 2017).

Uma vez que os parasitas de *Eimeria* invadem o intestino, as respostas imunes são coordenadas principalmente pelo GALT, que também é composto pela camada mucosa. O GALT serve como defesa do hospedeiro contra uma infecção patogênica, processando e apresentando antígenos. O GALT também produz anticorpos por meio do sistema imune humoral e de células dentro do próprio GALT, como as placas de peyer, células linfóides e de apresentação de antígenos encontradas através da camada mucosa intestinal, que ativam a imunidade mediada por células (Brandtzaeg et al., 1987).

Uma camada de muco não autodigerível revestindo a superfície interna é a primeira proteção do trato intestinal (Boleli e Morita, 2017). Faz parte dos vários sistemas de proteção desenvolvidos pelas células intestinais, tem papel importante contra a ação mecânica, lubrificando o intestino e, também, na proteção contra infecções, pois funciona como barreira protetora que impede o contato direto de microrganismos com as células epiteliais (Maiorka, 2004).

As mucosas podem desempenhar um papel importante na infecção intestinal e na recuperação da doença, ou ainda, podem diminuir o impacto da vacinação contra coccidiose. As células calciformes

secretam várias substâncias, como as mucinas (MUC2), moléculas bioativas ligadas à membrana apical (MUC1, MUC3 e MUC17), moléculas  $\beta$  como a resistina (RELM $\beta$ ), peptídeos (TFF) e Fc- $\gamma$  proteína de ligação (Fcgbp). A MUC2 é o componente mais abundante da camada de muco. Ela forma trímeros com os domínios do fator Von Willebrand que, acoplados com TFF e Fcgbp, resultam em uma camada de muco altamente viscosa, porém, permeável aos nutrientes (Boleli e Morita, 2017). Os genes expressos da família trifólios (TFF1, TFF2 e TFF3) interagem cooperativamente com a mucina para manter a função de barreira (Lee et al., 2006) e desempenham um papel importante no reparo da mucosa intestinal danificada, com a expressão aumentada após o dano da mucosa (Kurt-Jones et al., 2007). Os peptídeos TFF, são produzidos pelas células caliciformes e estão associados à restauração do epitélio intestinal (Kjellev et al 2009). A microbiota intestinal se fixa à camada mais exterior ao muco, interagindo com diversos oligossacarídeos da MUC2 (Linden et al.,2008; Kim e Ho, 2010; Kim e Khan, 2013).

A coccidiose causa lesões no intestino que predisõem a ave também à infecção por *Clostridium Perfringens* (McDevitt et al., 2006). A infecção por *C. Perfringens* nas células epiteliais também aumenta a produção de muco (Collier et al., 2008). Forder et al. (2012) consideraram genes de síntese de mucina intestinal (Muc) em aves desafiadas com *Eimeria*, *C. perfringens*, ou ambas, com ou sem antimicrobianos. Eles relataram que a expressão de Muc2 e Muc13 estava deprimida por um desafio com ambos os organismos, mas que os antimicrobianos impediram essa depressão. A infecção com *Eimeria* também diminuiu os níveis de RNAm do gene MUC2 (Kitessa et al., 2014). O aumento nos níveis de RNAm de Muc5ac no jejuno das aves desafiadas com *Eimeria* foi relatado por Forder et al. (2012). Esses autores também relataram um declínio significativo nos níveis de transcrição de RNAm de MUC13 e MUC2 em resposta ao desafio de *Eimeria* e *C. Perfringens*. Esses autores explicaram que, à medida que a mucosa se deteriora como resultado do desafio, a expressão de MUC2 torna-se impedida, o que poderia evitar o reabastecimento da camada de muco e aumentar a chance de novas infecções e danos.

### **2.3 Efeitos da coccidiose sobre requisitos nutricionais, metabolismo intestinal e microbiota**

A função de barreira comprometida durante um desafio por coccidiose leva a uma resposta inflamatória, aumento do vazamento de proteínas plasmáticas para o lúmen intestinal e má absorção de nutrientes (Joyner et al., 1975). Quando as aves experimentam uma infecção intestinal há relatos de aumento da produção de mucina como forma de aumentar mecanismos para prevenir a adesão de patógenos em superfícies epiteliais e proteger contra novas infecções (Collier et al., 2008; Horn et al., 2009). Conseqüentemente, o vazamento de proteínas plasmáticas e o aumento da mucogênese podem promover a proliferação de *Clostridium perfringens* e microbiota patogênica (Williams, 2005).

As vacinas vivas também são consideradas como um fator predisponente para a enterite necrótica (Chapman et al., 2002, Lehman et al., 2009). Os clostrídios utilizam proteínas plasmáticas, que são um substrato rico em nutrientes (McDougald, 2003; Montagne et al., 2004). O clostridium faz parte da microbiota normal dos cecos e um desbalanço do metabolismo normal do intestino em termos de digestibilidade de nutrientes e aumento de produção de mucinas pode fazer com que ele migre do ceco para o intestino delgado, causando enterite. Com o vazamento de proteínas plasmáticas ocorre um aumento da viscosidade da digesta, os nutrientes se tornam menos acessíveis ao hospedeiro e as fezes ficam mais úmidas, ocorrendo lesões na mucosa do intestino e desequilíbrio na microbiota intestinal, entre outros problemas.

A vacinação leva ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias que podem diminuir o apetite (Klasing e Barnes, 1988; Cartmell et al., 1999). A redução na ingestão de ração prejudica o desempenho dos frangos, pois resulta em aves consumindo menos nutrientes necessários para o reparo intestinal, função do sistema imunológico e crescimento. Portanto, uma resposta imune pode provocar uma série de mudanças metabólicas, resultando em uma interrupção na utilização de nutrientes e prejudicando o desempenho seja ela ocasionada pela infecção natural ou pela vacina. A má absorção de

nutrientes devido à coccidiose foi relatada para glicose, proteínas, aminoácidos, lipídios, energia metabolizável, minerais e carotenóides (Preston-Mafham e Sykes, 1970; Turk, 1973; Tyczkowski et al., 1991; Persia et al., 2006). Estudos que avaliaram digestibilidade ileal de aminoácidos de frangos desafiados com *Eimeria* relataram redução de 16% da digestibilidade (Amerah e Ravindran, 2015). Rochell et al. (2016) observaram uma redução linear na digestibilidade ileal aparente de todos os aminoácidos medidos, exceto triptofano e glicina.

Reduções de digestibilidade para glicina, treonina e cisteína em frangos desafiados têm sido comumente relatadas (Parker et al., 2007; Adedokun et al., 2012). Treonina, cisteína, glicina, serina e prolina, são os principais componentes estruturais da mucina intestinal e estão envolvidos na integridade intestinal (Adedokun et al., 2012). O aumento da mucogênese e a resposta imune elevada durante a infecção, provavelmente influenciarão as necessidades de aminoácidos dos frangos durante a coccidiose e os aminoácidos envolvidos nesses processos podem exibir as maiores perdas e tornarem-se limitantes (Parker et al., 2007). O aumento da mucogênese, rápida renovação e descamação das células intestinais, bem como o vazamento de proteínas plasmáticas para o lúmen causado pela coccidiose, provavelmente aumentarão as perdas de aminoácidos endógenos (Fernando e McCraw, 1973; Collier et al., 2008; Amerah e Ravindran, 2015).

A digestão e absorção de lipídios são processos relativamente complexos e as reduções na digestibilidade de lipídios durante a exposição a coccídios não são bem compreendidas. Kitessa et al. (2014) consideraram desafios com *Eimeria* e/ou *Clostridium perfringens* sobre o transporte de lipídios e metabolismo dos enterócitos testando a expressão do cluster de diferenciação 36 (CD36). O estudo observou diminuição significativa nos níveis de RNAm de CD36 em resposta aos principais efeitos da infecção por *Eimeria* e *Clostridium perfringens*, sugerindo que esses protozoários interrompem os processos metabólicos nas células epiteliais do intestino delgado (Kitessa et al., 2014). Estudos mostraram que CD36 desempenha um papel na absorção de ácidos graxos de células intestinais (Chen et al., 2001; Kitessa et al., 2014) e é uma das três

proteínas de transporte de ácidos graxos conhecidas (Abumrad, et al., 1993).

A redução do consumo de ração e as mudanças metabólicas que ocorrem durante uma doença intestinal podem influenciar as necessidades nutricionais das aves (Choct, 2009). Ajustes dietéticos, especialmente durante os períodos de interrupção intestinal, podem melhorar o desempenho dos frangos. Durante os períodos de digestibilidade reduzida dos aminoácidos, as dietas para frangos de corte que contêm um aumento no suprimento total de aminoácidos podem levar a uma melhora geral em frangos vacinados para coccidiose. O aumento das concentrações de aminoácidos suplementares na dieta pode apoiar o desempenho dos frangos de corte durante um período de infecção, e o uso de gelatina, por ter aminoácidos altamente digeríveis, pode ser benéfico durante os períodos de lesão intestinal.

A alta digestibilidade dos aminoácidos suplementares oriundos da gelatina, além do aumento dos níveis de inclusão, pode beneficiar frangos de corte quando a capacidade de absorção do intestino é prejudicada e a digestibilidade dos nutrientes é comprometida devido a uma interrupção na integridade intestinal. Compreender a suplementação de nutrientes durante os períodos de dano intestinal ocasionado pela vacinação é fundamental para fornecer estratégias nutricionais que apoiem o desempenho dos frangos durante os estágios críticos da vacinação.

## **2.4 Gelatina**

O colágeno é uma proteína fibrosa encontrada em todo o reino animal, contém cadeias peptídicas dos aminoácidos glicina, prolina, lisina, hidroxilisina, hidroxiprolina e alanina (Silva et al., 2011). A gelatina comercial é um produto proteico solúvel em água quente, obtida por meio de hidrólise parcial do colágeno (Haug et al., 2004). A análise da gelatina mostrou apenas a presença de 14 aminoácidos, tendo como característica peculiar alto conteúdo de glicina, hidroxiprolina e prolina (Tabela 2). A gelatina contém 90-95% de proteína bruta (Boomgaardt e Baker, 1972), e



tem mais de 90% de digestibilidade (Reuhmmtersward, 1984) (Tabela 1). É uma proteína deficiente em todos os aminoácidos essenciais principalmente em triptofano e cisteína. Por outro lado, embora a gelatina não apresente composição adequada para promover crescimento e manter o balanço de nitrogênio no organismo, seu perfil atípico de aminoácidos estimula a síntese de colágeno nas cartilagens e na matriz extracelular dos tecidos (Moskowitz, 2000; Nickerson et al., 2006). Glicoproteínas de alto peso molecular são os constituintes da camada de muco protetor que cobre as células epiteliais do trato gastrointestinal, considerado como a primeira linha em defesa contra patógenos intestinais (Walk et al., 2011a). Após uma infecção por coccidiose, as aves aumentam a produção de muco e precisam regenerar os filamentos de mucina na superfície dos enterócitos danificados (Lehman et al., 2009). A vacinação induz a camada mucosa a produzir mais mucina (Miller et al., 1979; Miller e Narva, 1979). O aumento da produção de muco aumenta necessidade para treonina, glicina e serina (Gli + Ser) e prolina (Moran, 2008). A mucina é composta por uma alta porcentagem de aminoácidos como treonina, prolina, glicina e serina (Lehman et al., 2009). Embora a ave seja capaz de sintetizar estes, a síntese pode não ser suficientemente rápida para satisfazer altas demandas, especialmente após o dano no tecido intestinal causado por infecção ou pela administração da vacina contra a coccidiose (Corzo et al., 2004; Jiang et al., 2005; Dean et al., 2006).

A eficácia das vacinas anticoccidianas está relacionada à função imune adequada em aves, o que, por sua vez, está associado à nutrição adequada. Lehman et al. (2009) testou a adição dietética de gelatina, como fonte de aminoácidos condicionalmente essenciais, como glicina, serina e prolina, para dietas com baixo e alto nível de proteína para auxiliar a recuperação de uma vacina de oocisto vivo. Neste estudo, os resultados de desempenho nas primeiras três semanas e todo o período experimental (0-8 semanas) confirmaram o efeito prejudicial da vacinação sobre o desempenho precoce das aves. A adição de gelatina melhorou a resposta da vacinação, concluindo que os aminoácidos condicionalmente essenciais podem ser fatores importantes na recuperação de vacinas vivas.

A administração de colágeno hidrolisado de origem bovina e suína para reduzir os efeitos de úlceras, foi observada em ratos. Esse tratamento reduziu de 40% a 77% o índice de lesão de úlceras no trato gastrointestinal. O mecanismo para a proteção da mucosa envolveu um aumento significativo (50-267%) da produção de muco. Assim, o colágeno hidrolisado, tanto de origem bovina quanto o de origem suína, apresentou efeito aumentando a produção de muco (Castro et al., 2010), e poderia ser um excelente ingrediente para aumentar aminoácidos condicionalmente essenciais e diminuir os efeitos da vacinação de coccidiose em frangos de corte.

**Tabela 1.** Composição nutricional da gelatina bovina utilizada no experimento

<b>INFORMAÇÃO NUTRICIONAL</b>	
	Quantidade em 100g de produto
Calorias	369 kcal – 1549 kJ
Gordura total	0 g
Gordura saturada	0 g
Gordura trans	0 g
Colesterol	0mg
Sódio	≤250mg
Carboidratos totais	0 g
Fibra dietética	0 g
Açúcares totais	0 g
Proteína bruta	87 g
Vitamina D	0 mcg
Cálcio	152.70 mg
Ferro	1.90 mg
Potássio	2.50 mg

**Tabela 2.** Perfil de aminoácidos da gelatina utilizada no experimento

100 gramas	Mínimo (g)	Máximo (g)
Alanina	8.20	9.15
Arginina	6.97	7.78
Ácido Aspártico	5.28	5.89
Ácido Glutâmico	9.25	10.33
<b>Glicina</b>	<b>22.06</b>	<b>24.63</b>
Histidina*	0.69	0.77
Hidroxiprolina	10.21	12.48
Hidroxilisina	0.50	1.20
Isoleucina*	1.41	1.57
Leucina*	2.70	3.01
Lisina*	3.39	3.78
Metionina*	0.82	0.91
Fenilalanina*	1.79	1.99
<b>Prolina</b>	<b>12.80</b>	<b>14.29</b>
Serina	3.07	3.43
Treonina*	1.68	1.87
Tirosina	0.47	0.53
Valina*	2.08	2.33

\* Aminoácidos essenciais

## 2.5 Vitamina E

A vitamina E é o principal antioxidante lipossolúvel presente na membrana celular. Desempenha um papel importante como antioxidante lipídico sequestrando radicais livres nas membranas de células e órgãos subcelulares (Leshchinski e Klasing, 2001). Suplementação com vitaminas antioxidantes como a vitamina E, protegem as respostas imunes em indivíduos expostos a radicais livres (Fialkow et al., 2007).

Dunstan et al., (2006) e Wintergerst et al., ( 2007) demonstraram que o suplemento de vitamina E aumentou o título de anticorpos para uma vacina específica, aumentando assim as funções mediadas pelas células T. Em um trabalho oferecendo de 0 a 200 mg/kg de suplementação de vitamina E a frangos sob desafio vacinal, Leshchinski e Klasing (2001) encontraram que os níveis moderados (25 e 50 mg/kg) foram mais imunomoduladores do que os mais altos. Para explicar os resultados, os autores formularam a hipótese de que os níveis

moderados (25 e 50 mg/kg) e os altos (100 e 200 mg/kg) de suplementação têm efeitos diferentes no balanço antioxidantes/radicais livres, alterando assim os eventos que se sucedem na atividade das células imunitárias. Os autores concluíram que a produção de anticorpos depende da natureza do antígeno e que níveis de 25 a 50 mg/kg de vitamina E seriam mais efetivos em desencadear resposta imune do que níveis altos. A vitamina E também foi relatada influente sobre a atividade fagocitária de macrófagos na fase jovem da vida das aves (Konjufca et al, 2004).

Sabe-se que a vitamina modula a sinalização inflamatória, regula a produção de prostaglandinas e leucotrienos (Friedman et al.,1998). Os efeitos anti-inflamatórios, se dão porque a vitamina E inibe os eicosanóides mediados por ciclooxigenase (COX-2), uma enzima chave que catalisa a conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxanos, também inibe a lipoxigenase (5-LOX), a qual é uma enzima chave na biossíntese dos leucotrienos (Jiang 2014). A vitamina E também atua suprimindo os fator de transcrição (NF- $\kappa$ B) e (JAK-STAT 6) ou vias de sinalização JAK-STAT3 em vários tipos de células imunes, principalmente citocinas antiinflamatórias (Jiang, 2014).

Sakamoto et al. (2006), trabalhando com frangos de corte, encontraram maior produção de anticorpos contra SRBC, aos 10 dias de idade, com 10 mg/kg de vitamina E associada à glutamina do que com 500 mg/kg, não obtendo resposta aos 35 dias de idade. Boa-Amponsem et al. (2000) observaram queda na produção de anticorpos, maior relação heterófilo/linfócito (H/L) e resposta celular deprimida seis dias após a inoculação de SRBC em galos recebendo 300 mg/kg de vitamina E na dieta, quando comparados aos que receberam 10 mg/kg.

Silva et al. (2011) desafiaram frangos de corte suplementadas com vitamina E com vacina contra coccidiose e contra a Doença de Newcastle. As aves que receberam 65 mg/kg de vitamina E apresentaram reação celular duradoura e maior produção de anticorpos, o que indica que esse nível de vitamina E melhorou a resposta imune celular das aves devido às suas propriedades antioxidantes e imunomoduladoras. A vitamina E por ser um anti-inflamatório não esteroide auxilia na diminuição

dos efeitos pró-inflamatórios pós vacinais, e poderá minimizar as reações vacinais contra coccidiose.

### **3. HIPÓTESES E OBJETIVOS**

#### **3.1 Hipóteses**

Como resposta à vacinação contra coccidiose, a mucosa intestinal aumenta a produção de mucina e diminui a absorção de nutrientes. A mucina contém componentes com possíveis sítios de ligação ao patógeno e a menor digestibilidade dos nutrientes pode beneficiar a microbiota patogênica. A vacina pode alterar o microbioma intestinal comparada aos métodos comuns de controle da coccidiose (anticoccidianos), e isso pode influenciar o desempenho dos frangos de corte.

A vacina contra coccidiose causa desequilíbrio imunológico em direção a um estado pró-inflamatório comparada aos anticoccidianos. A suplementação com gelatina pode fornecer aminoácidos não-essenciais requeridos em maiores quantidades devido ao aumento na produção de muco, regenerando os filamentos de mucina na superfície dos enterócitos e diminuindo os efeitos da vacina sobre o epitélio intestinal. Já a vitamina E por ser um anti-inflamatório não esteroide, auxilia na diminuição dos efeitos pró-inflamatórios pós vacina.

#### **3.2 Objetivos**

##### **3.2.1 Geral**

Avaliar os efeitos da vacina para coccidiose sobre a microbiota cecal. Avaliar se a suplementação com gelatina e vitamina E pode mitigar os efeitos negativo da vacina.

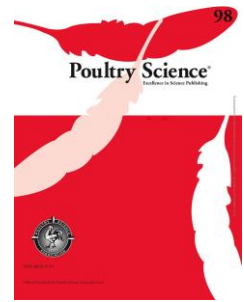
##### **3.2.2. Específicos**

- Avaliar os efeitos da vacina viva atenuada para coccidiose sobre a microbiota intestinal comparada à salinomicina.
- Avaliar a atividade anti-inflamatória da vitamina E e o efeito da suplementação de gelatina.

## CAPÍTULO II

<sup>1</sup> Artigo científico publicado na revista *Poultry Science*

# Journal Pre-proof



Changes in the ceca microbiota of broilers vaccinated for coccidiosis or supplemented with salinomycin<sup>1</sup>

C. Orso, T.B. Stefanello, C.H. Franceschi, M.B. Mann, A.P.M. Varela, I.M.S. Castro, J. Frazzon, A.P.G. Frazzon, I. Andretta, A.M.L. Ribeiro

PII: S0032-5791(20)31020-8

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.12.066>

Reference: PSJ 969

To appear in: *Poultry Science*

Received Date: 9 June 2020

Revised Date: 28 November 2020

Accepted Date: 15 December 2020

Please cite this article as: Orso C., Stefanello T.B., Franceschi C.H., Mann M.B., Varela A.P.M., Castro I.M.S., Frazzon J., Frazzon A.P.G., Andretta I. & Ribeiro A.M.L., Changes in the ceca microbiota of broilers vaccinated for coccidiosis or supplemented with salinomycin<sup>1</sup>, *Poultry Science* (2021), doi: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.12.066>.

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© YEAR Published by Elsevier Inc. on behalf of Poultry Science Association Inc.



**Changes in the ceca microbiota of broilers vaccinated for coccidiosis or supplemented with salinomycin<sup>1</sup>**

C. Orso<sup>1</sup>, T. B. Stefanello<sup>1</sup>, C. H. Franceschi<sup>1</sup>, M.B. Mann<sup>3</sup>, A. P. M. Varela<sup>3</sup>, I. M. S. Castro<sup>4</sup>, J. Frazzon<sup>2</sup>, A. P. G. Frazzon<sup>3</sup>, I. Andretta<sup>1</sup>, A.M.L. Ribeiro<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Animal Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup> Department of Microbiology, Porto Alegre, Brazil

<sup>4</sup> Universidade Federal de Ciências de Saúde de Porto Alegre

\* *Corresponding author:*

Andréa Machado Leal Ribeiro  
Laboratório de Ensino Zootécnico  
Avenida Bento Gonçalves 9600, Porto Alegre, RS, Brasil.  
CEP: 91540-000  
Telefone: +55 51 33086854  
Fax: 55 55 3221 4175  
E-mail: [aribeiro@ufrgs.br](mailto:aribeiro@ufrgs.br)

*Scientific Section*

*Immunology, Health and Disease*

36 **ABSTRACT** The objective of this study was to characterize differences in the cecal  
37 microbiota of chickens vaccinated for coccidiosis or receiving Salinomycin in the diet.  
38 In this study, 140 male 1-day-old broiler chickens were divided in 2 groups: Vaccine  
39 group (live vaccine) vaccinated at the first day and Salinomycin group (60 ppm/kg  
40 since the first day until 35 days of age). Each treatment was composed for 7 replicates  
41 of 10 birds per pen. At 28 days, the cecal content of one bird per replicate was collected  
42 for microbiota analysis. The genetic sequencing was conducted by the Miseq Illumina  
43 platform. Vaccine group showed lower body weight, weight gain and poorer feed  
44 conversion in the total period ( $P < 0.05$ ). Bacterial 16S rRNA genes were classified as 3  
45 major phyla (Bacteroidetes, Firmicutes, and Proteobacteria), accounting for more than  
46 98% of the total bacterial community. The microbiota complexity in the cecal was  
47 estimated based on the  $\alpha$ -diversity indices. The vaccine did not reduce species richness  
48 and diversity ( $P > 0.05$ ). The richness distribution in the Salinomycin group was larger  
49 and more uniform than the vaccinated birds. Salinomycin group was related to the  
50 enrichment of Bacteroidetes, while Firmicutes and Proteobacteria phyla were in greater  
51 proportions in the Vaccine group. The last phylum includes a wide variety of  
52 pathogenic bacteria. Vaccination against coccidiosis The vaccine did not decrease the  
53 species richness but decreased the percentage of Bacteroidetes, a phylum composed by  
54 genera that produce short chain fatty acids improving intestinal health. Vaccine group  
55 also had higher Proteobacteria phylum, which may help explain its poorer performance.

56

57 **Keywords:** broiler chicken, cecal bacterial community, 16S rRNA sequencing

58

59

60

61

62

63

## INTRODUCTION

64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90

The concerns about the development of antimicrobial resistance and potential antibiotic residues in meat and eggs were recently increased, pressing the poultry industry to reduce, or even eliminate, the use of anticoccidials in poultry diets. Intensive production system depends on antimicrobials to prevent and treat diseases, as well as, to enhance growth performance and the prohibition of antimicrobials as additives may lead to an increase in the incidence of enteric diseases (Castanon, 2007).

*Eimeria*, an apicomplexan protozoan parasite, is the cause of coccidiosis in the poultry industry. Coccidial infection in broilers results in epithelial cells damage, diarrhea, osmotic stress in the intestine (Perez-Carbajal et al., 2010) and, consequently, malabsorption of nutrients (Metzler-Zebeli et al., 2009). As an alternative to the use of anticoccidials, there are vaccines against coccidiosis. However, the performance of the broilers receiving this vaccine is lower compared to broilers that receive anticoccidial in the diet (Arczewska-Włosek et al., 2018). The administration of live oocysts through the vaccine results in a low infection level of the intestinal tract, necessary for immunity induction. Mucosal response to vaccination involves an increase in mucin production (Miller et al., 1979; Miller and Nawa, 1979). The mucin layer contains a diversity of carbohydrate components, with potentially attachable sites for commensal and pathogenic bacteria (Sonnenburg et al., 2005). Notably, some pathogens utilize mucin as a nutrient source (Adedokun et al., 2012). The increased vaccine-induced mucogenesis may increase the proliferation of pathogenic microbiota, worsening performance.

Therefore, a better characterization of how vaccine impacts the chickens cecal microbiota is fundamental to improve the use of this alternative method. This study was designed to understand how vaccine changes the intestinal microbiome compared

91 to the common methods of fighting coccidiosis (anticoccidials), in the perspective of  
92 explaining the effects in broilers performance.

### 93 **MATERIAL AND METHODS**

94  
95 All procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Use from the  
96 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil (35670).

97

#### 98 ***Experimental procedures***

99 A total of 140 broiler chicks of Cobb ® strain, with one-day of age, were raised  
100 in a poultry house comprised of 14 pens. Each pen housed 10 chicks up to 42 days of  
101 age. At the beginning of the trial, the groups were distributed with a 2.5% weight  
102 variation of the mean of the total group. The average weight of the 1-day- old chicks  
103 was 48.3 g. The broilers were reared in a wood shaving litter that had been reused for  
104 six times. This approach represents a more realistic concept of the field condition.  
105 Environmental temperature management to maintain chickens in thermoneutral  
106 conditions during all growth stages were performed using air conditioning, fans and  
107 exhaust fans according to the range established by cobb manual was followed. The  
108 temperature (celsius) and relative humidity (%) were measured daily and the maximum  
109 and minimum were registrate and we can sure there was a humid and hot environment  
110 capable of stimulate sporulation and reinfection. We also lightly humidify the litter in  
111 the sixth day to assure those conditions.

112 The basal diets consisted of corn and soybean meal, as main ingredients, and  
113 were isonutritive (Table 1). Feed and water were available *ad libitum* from tubular  
114 feeders and nipple drinkers. Half of the chicks received a diet containing 60 ppm of  
115 Salinomycin since the first day, until 35 days of age, and the other half were vaccinated,  
116 via water, against coccidiosis with a live attenuated vaccine (LIVACOX, 30 - 50  
117 thousand oocysts of each attenuated strain of *E. tenella*, *E. acervulina* and *E. maxima*)

118 on the first day of life. Broiler weight and feed intake were measured weekly. These  
119 data were used to calculate the average daily gain, daily feed intake, and feed  
120 conversion ratio.

### 121 ***Sample Collection, Cecal DNA Extraction and Library Preparation***

122 At 28 days of age, 1 bird within the average weight of each replicate were  
123 euthanized. When the birds were slaughtered for the sample collection of the cecal  
124 content, scores of the 1 and 2 intestinal lesions (Johnson and Reid Scale 1970) were  
125 observed in the vaccinated birds. Ceca luminal samples were collected from the  
126 bottom of the cecum aseptically. All samples were gathered within 30 min after  
127 slaughter and immediately transferred into a -80 °C refrigerator until use sample  
128 analysis.

129 The cecal samples were thawed and homogenized, and ~200 mg of each sample  
130 was used for extraction of microbial genome DNA using the E.Z.N.A. Stool DNA Kit  
131 (Omega Bio-Tek) according to the manufacturer's instructions. The DNA concentration  
132 was measured by Qubit® 3.0 Fluorometer.

133 The V4 region of bacterial 16S rRNA gene was amplified using F515  
134 (5'CGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGCCAGCMGCCGCGGA 3') and R806  
135 (5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTACHVGGGTWTCA 3') primers  
136 to characterize the cecal bacterial composition, both modified to contain an Illumina  
137 adapter region as described by Caporaso et al. (2010). Amplification was performed in a  
138 25 µL mixture, consisting of ~100 ng of genomic DNA, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µM of each  
139 primer, 0.2 mM of each dNTP, 2U PlatinumTaq DNA Polymerase High Fidelity (Life  
140 Technologies), and 1x reaction buffer. Amplification was carried out in a Mastercycler  
141 Personal 5332 Thermocycler (Eppendorf®) according to the following program: initial

142 denaturation at 94 °C for 2 min, followed by 25 cycles of 45 sec at 94 °C, 45 sec at 55  
143 °C 1 min at 72 °C and a final cycle at 72 °C for 6 min. Five microliters of each PCR  
144 product was used to verify amplification by gel electrophoresis on a 1 % agarose gel.

145 Amplicons were purified using Agencourt AMPure XP beads following  
146 manufacturer instructions. Purified products were again quantified checked in Qubit®  
147 Fluorometric Quantitation. Indexes were added to DNA libraries following the  
148 manufacturer instructions (Illumina Inc., San Diego, California, USA). Sequencing was  
149 conducted on platform Illumina MiSeq with a v2 500 kit, which generates paired-end  
150 reads of 250 bp.

### 151 *Sequences Processing, Classification of samples and Statistical analysis of* 152 *microbiota and performance*

153 Bioinformatics analysis of 16S rRNA amplicons were performed using QIIME 2  
154 version 2019.4 (Bolyen et al., 2019). Raw sequence data were quality filtered, denoised  
155 and chimera filtered using the q2-dada2 plugin with DADA2 pipeline Callahan  
156 (Callahan et al., 2016). The 5' end 5 nucleotide bases were trimmed from forward and  
157 reverse read sequences due to low quality. Reads with a number of expected errors  
158 higher than 2 were discarded. Read length filtering was applied and the reads were  
159 trimmed at the first instance of a quality score less than or equal to 11. The resulting  
160 reads with nucleotide overlap between the forward and reverse reads below 20 and  
161 shorter than 250 bp length were discarded. Chimera removal was performed using the  
162 consensus method. The amplicon sequence variants (ASVs) obtained by DADA2  
163 pipeline were merged into a single feature table using the q2-feature-table plugin. The  
164 ASV's were aligned with MAFFT (via q2-alignment) (Katoh, 2002) and used to  
165 construct a phylogeny with fasttree2 (via q2-phylogeny) (Price et al., 2010). Taxonomy

166 was assigned to ASV's using the q2-feature-classifier (Bolyen et al., 2019) classify-  
167 sklearnnaïve Bayes taxonomy classifier. The classifier was trained using extracted  
168 Greengenes 13\_8 reference sequences with 99% similarity truncated at 250 bp length  
169 from 16S rRNA variable region 4 (V4). The resulting feature table, rooted tree from  
170 reconstructed phylogeny, and taxonomy classification were imported from Qiime2 to R  
171 v3.6.1 environment for further data analysis using Microbiome v1.6.0 (Stevenson and  
172 Weimer, 2007) and Phyloseq v1.28.0 R packages (McMurdie and Holmes, 2013). For  
173 Taxonomic analysis, feature table was transformed to compositional data for taxa bar  
174 plot composition visualization of the 10 most abundant genera using plot composition  
175 function from Microbiome R package. Community Analysis, Alpha-diversity metrics  
176 (Shannon, Simpson, Chao1, Log Modulo Skewness), beta diversity metrics Weighted  
177 UniFrac (Lozupone and Knight, 2005), unweighted UniFrac (Lozupone et al., 2007) and  
178 Bray-Curtis dissimilarity were estimated using Microbiome and Phyloseq packages in R  
179 statistical software. R. Canonical Correspondence Analysis (CA) and Detrended  
180 correspondence analysis (DCA) were applied to beta diversity chosen metrics using plot  
181 ordination function from Phyloseq. Alpha diversity significance was estimated with a  
182 pairwise comparison using the non-parametric test Wilcoxon (WILCOXON, 1946), by  
183 Microbiome R package functions. Beta diversity significance were estimated with a  
184 permutational multivariate analysis of variance (Anderson et al., 2011) using distance  
185 matrices obtained by ordination previously described with Permutational Multivariate  
186 Analysis of variance test (PERMANOVA), Adonis function of Vegan R package  
187 (Oksanen et al., 2007).

188         The ASV's, with less than two samples and less than 20 abundance frequency,  
189 were removed from the feature table. The resulting filtered features were grouped  
190 collapsed at genus level using q2-taxa plugin for differential abundance analysis.

193 Differential abundance analysis was performed using ANCOM q2-composition plugin,  
194 with mean difference as fold difference in feature abundances across groups and  
195 centered log-ratio (clr) as transform-function for volcano plot. All sequence data have  
196 been deposited in the NCBI Sequence Read Archive (accession no. PRJNA594997).

197 Data of broilers performance were analyzed by ANOVA using the Generalized  
198 Linear Model (GLM) procedure of SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC) and the level of 5%  
199 was the significance level considered.

200

## 201 **RESULTS AND DISCUSSION**

### 202 **Performance of broilers**

203 The performance data are presented in **Table 2**. Broilers that received  
204 Salinomycin had higher body weight at 42 days, higher weight gain and, consequently,  
205 a better feed conversion rate than the Vaccine group ( $P < 0.05$ ). No differences were  
206 observed for feed intake ( $P > 0.05$ ). The effects of those drugs are not fully understood,  
207 but the potential of the intestinal microbiota in increasing feed efficiency has been  
208 shown (Singh et al., 2012; Cox et al., 2014) and may be considered in this study.  
209 Challenged broilers receiving monensin reduced the bacterial domain and *E. coli*  
210 (Moraes et al., 2019) and Ribeiro et al. (2000) observed that broilers receiving  
211 monensin, without any microbial challenge, showed better feed conversion in relation to  
212 broilers without the drug, especially from 21 to 40 days.

213 Anticoccidial compounds have been used to control coccidiosis, but *Eimeria*  
214 species have developed resistance to both chemical and ionophore drugs over time  
215 (Stringfellow et al., 2011). In addition, the use of these substances in animal production  
216 can turn bacterial strains resistant to the environment. Vaccines, as an alternative for the  
217 control of coccidiosis, provide protection and also help reducing resistance to *Eimeria*



218 by systematically replacing resistant field strains and inducing specific protective  
219 immunity by exposing the broilers immune system to *Eimeria* antigens (Williams and  
220 Gobbi, 2002; Dalloul and Lillehoj, 2005; Stringfellow et al., 2011)

221 Administration of live oocysts of the vaccine results in a low level of infection  
222 necessary for immunity development (Dalloul and Lillehoj, 2005; Li et al., 2005;  
223 Stringfellow et al., 2011). This low level of infection is one of the factors responsible  
224 for affecting performance. The infection, even low, leads to decreased absorbent  
225 intestinal surface area and generates an inflammatory process (Lehman et al., 2009). As  
226 the poultry cycle is short, the producer who uses vaccines faces a dilemma: there is not  
227 always time enough for broilers to recover the weight. In this experiment, we observed  
228 that Vaccine group were not able to achieve the same performance as Salinomycin  
229 supplemented broilers.

230 The pyrogenic effect of the vaccine can increase body temperature and energetic  
231 demand, diverting nutritional resources from performance to maintain body  
232 homeostasis. In addition to this demand, the intestinal mucosa responds to vaccination  
233 by increasing mucin production as a form of protection (Miller and Nawa, 1979; Miller  
234 et al., 1979). Mucin is composed of amino acids, such as threonine, glycine, proline and  
235 serine (Faure et al., 2005; Lehman et al., 2009), as well as, carbohydrates with possible  
236 pathogenic attachable sites (Sonnenburg et al., 2005) and increasing mucin production  
237 may benefit pathogenic microbiota proliferation (Adedokun et al., 2012). This feature  
238 may also be a predisposing factor for a poor performance. The variation in the growth  
239 rate may be associated with differences in the microbiome, which has a considerable  
240 effect on nutrient digestion, absorption, and metabolism in animal's body (Turnbaugh et  
241 al., 2006; Rinttilä and Apajalahti, 2013), and it is also highly associated with host  
242 immune systems and health status in animals (Lan et al., 2005; Kogut, 2013).

243

#### 244 **Microbiota cecum**

245 A total of 75209 reads were randomly subsampled to normalize sequence  
246 numbers. The subsampling yielded a coverage of 99.9%, indicating that it was  
247 representative of the total population.

248

#### 249 **Alpha diversity**

250 There was no statistical difference between groups regarding to the estimated  
251 richness (Chao1) or diversity (Simpson, Shannon and Skewnees indices) (Figure 1). The  
252 vaccine did not decrease the species richness estimated by the Chao index ( $P = 0.94$ )  
253 compared to the Salinomycin group . Also, there were no differences for diversity  
254 species through the Simpson Index ( $P = 0.84$ ), Shannon ( $P = 0.95$ ) and Skwnees ( $P =$   
255  $0.73$ ). On the other hand, independently the statistical significance, Chao1 index showed  
256 a larger and more uniform distribution in Salinomycin broilers, while Shannon graphic  
257 showed a lower  $\alpha$ -diversity species for the microbiota of vaccinated broilers. According  
258 to Yegani and Korver (2008), several factors such as diet, environment, and genetics  
259 induce changes in the intestinal microbiota; the use of antimicrobials is one of the most  
260 important factors.

261

#### 262 **Beta diversity**

263 Detrended correspondence analysis (DCA) of genes was used to evaluate  
264 functional structure changes in the microbial communities. DCA did not clearly  
265 separate populations, with a 27.7% and a 37% variation explained for DCA1 and  
266 DCA2, respectively (Figure 2A). This indicates that the structures of the bacterial  
267 communities are very similar between both groups. The ordering of bacterial

268 communities (CA1 13,2% and CA2 16,1%) showed a non-distinct cecum microbiota  
269 according to intervention (Figure 2B), contrarily to the finds of Czerwiński et al., (2012)  
270 whom showed that Salinomycin supplementation suppressed microbial activity and alter  
2712 the microbial community structure.

2722

### 273 **Relative Abundances**

274 As it was seem, none of the treatments caused significant changes in the cecal  
275 microbial structure (related to the genera that form a community and how they are  
276 distributed), but it affected the microbial participation (the different percentages of  
277 phyla and genera in the cecum). In both treatments, five phyla were more common  
278 (>1%), highlighting the predominance of Firmicutes and Bacteroidetes, followed by a  
279 small proportion of Cyanobacteria, Proteobacteria, and Tenericutes. Whithin the groups,  
280 Salinomycin had higher Bacteroidetes proportions (54.6 vs. 44,5%), while Firmicutes  
281 were in lower proportions (42.8 vs. 51.4%; Figure 3), compared to Vaccine group.  
282 Firmicutes and Bacteroidetes have been associated with higher energy uptake bacterial  
283 profiles capacity (Xiao et al., 2017) and the last one, has been associated with short  
284 chain acid metabolism (Pandit et al., 2018). Short chain fatty acids (SCFA) are  
285 considered stimulators of broiler performance and intestinal epithelium growth as well  
286 as modulators of composition and activity of the gastrointestinal microbiota  
287 (Czerwiński et al., 2012) attributed the best performance of chickens to the increase of  
288 the Bacteroidetes phylum.

289 Firmicutes are in smaller proportions in the Salinomycin group. Most of this  
290 phylum of bacteria, have a gram-positive cell wall and the results can be explained as  
291 Salinomycin exhibit high activity against gram-positive bacteria. Firmicutes are  
292 associated with the fermentation of undigestible feeds in the ceca, improving the

293 digestibility of nutrients. However, Lee et al. (2017) did not associate or correlate this  
294 group with better broiler performance. The Proteobacteria more than doubled its  
295 percentage in the Vaccine group (1.2% vs. 3.1%). This phylum is formed by gram-  
296 negative bacteria and includes a wide variety of pathogenic species such as *Escherichia*  
297 *spp.*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas spp.* The lower percentage of  
298 Proteobacteria phylum in Salinomycin group may indicate a healthy intestinal  
299 environment (Dai et al., 2018), and probably contributed for the better performance  
300 observed in this chickens. Tenericutes phylum (0.8 vs. 0.1%) e Cyanobacteria (0.5 vs.  
301 0.7%) were also classified, but these bacteria were present at relatively low abundance.

302 At the genus level, genera whose proportion exceeds 1% corresponds to 68.5%  
303 and 61.5% of the total genera found for the Salinomycin and Vaccine groups,  
304 respectively. Within the phylum Bacteroidetes, *Bacteroides* genus were found in the  
305 highest percentages in the caeca ( 39% in the Salinomycin vs. 36% in the Vaccine  
306 group). This genus is related to the ability to degrade indigestible fiber in the cecum  
307 (Lee et al., 2017). The fermentation of indigestible fibers may increase the production of  
308 SCFA, helping the host-beneficial cecal microbiota. A higher relative abundance of  
309 *Alistipes* in the Salinomycin group was observed in relation to the Vaccine group (10  
310 vs. 5%). *Alistipes* belong to the same Bacteroidetes phylum and is the main member  
311 within Rikenellaceae family. They are resistant organisms with the ability of fermenting  
312 carbohydrate to produce acetic acid and are generally considered as beneficial bacteria  
313 (Rautio et al., 2003). *Odoribacter*, the mainly detected genus in the  
314 Porphyromonadaceae family was found in a similar percentual between both groups  
315 (1.6 vs. 1.4%). This genus is very important for both microbial and host epithelial cell  
316 growth (Meehan and Beiko, 2014).

317 As for Firmicutes phylum, the genus *Oscillospira*, was observed in a percentage  
318 of 4.1% for Salinomycin group and 5.1% for Vaccine group. In the same phylum, the  
319 Ruminococcus genus was found in a proportion of 3.8% in Salinomycin and 2.6% in  
320 Vaccine group. As members of Ruminococcaceae family, this genus can produce SCFA  
321 through glucose metabolism and digest cellulose in feed (Liu et al., 2008).

322 The Lactobacillus genus was observed at 4.5 vs. 5.2%, for Salinomycin and  
323 Vaccine groups respectively. This genus is considered a crucial member of the  
324 commensal microbiota regarding health of the host. In a study developed by Czerwinski  
325 et al., (2012), the authors noted a lower value of total bacteria and Lactobacillus in the  
326 cecum of chickens fed a Salinomycin-supplemented diet. The authors justified that this  
327 drug can suppress the dominant lactic acid bacteria, potentially Lactobacillus. As seem,  
328 in our experiment, although no statistical difference was found between the treatments,  
329 it was observed a lower percentage of lactobacillus in the Salinomycin group.  
330 Faecalibacterium genus showed similar amount in both groups (2.3 vs. 2.4%). Male  
331 chickens with higher body weight were associated to the enrichment of  
332 Faecalibacterium (Lee et al., 2017). *Subdoligranulum* genus, member of Firmicutes  
333 family was presented at 1.2 vs. 0.6% for Salinomycin and Vaccine birds, respectively.  
334 This genus comprises species that produce butyrate in caeca (Lund et al., 2010).  
335 *Shigella* affiliated to Proteobacteria, potentially pathogenic, was found in similar  
336 percentages in both groups (1.1 vs. 1.6%), showing no treatment influence.

337 One of the major concerns using vaccine to control coccidiosis is the  
338 predisposition of opportunistic bacteria proliferation such as *Clostridium*, which may  
339 benefit from mucus produced by the epithelium and cause disease such as necrotic  
340 enteritis. In our study, the genus *Clostridium* appeared at level <1% and did not show  
341 statistical difference between groups.

342 The relationship between the genus found in cecal microbiota shows that groups  
343 of *Bacteroides* have a strong relationship to each other, and also to the genus *Alistipes*  
344 (Distance 0.1) (Figure 4), possibly because they are formed by beneficial  
345 microorganisms, responsible for degrading insoluble fibers and generating SCFA.  
346 *Bacteroides* also have a close relationship to the genus *Lactobacillus*, *Subdoligranulum*  
347 and *Faecalibacterium* (Distance 0.1). The genus *Alistipes* has a moderate relationship  
348 to *Defluviitaleia* and *Oscillospira* (Distance 0.2), and a strong relationship to  
349 *Faecalibacterium* (Distance 0.1).

350 The genus of *Ruminococcus* has a strong relationship (Distance 0.1) to *Shigella*  
351 and *Streptococcus*, which are pathogenic bacteria causing harm to healthy birds. This  
352 relationship is still poorly understood and it's not possible to describe in what sense it  
353 goes: we cannot describe in what sense it goes: whether it is beneficial or maleficent.  
354 Undoubtedly one of the most important and discussed groups of bacteria is the  
355 *Clostridium* genus. This genus was shown to be moderately related to *Lactobacillus* and  
356 *Oscillospira* (Distance 0.2), but strongly correlated with *Shigella*, a pathogenic group  
357 (Distance 0.1). In this case, *Lactobacillus* and *Oscillospira* could control the population  
358 growth of the genus *Clostridium* and in the last case, a correlation in the same direction,  
359 i.e., causing damage to the birds.

360 The difference between coccidiosis control methods, Salinomycin vs. Vaccine,  
361 lays in the fact that birds receiving Salinomycin have a higher percentage of phyla and  
362 genera related to short chain fatty acid production, resulting in the improvement of  
363 intestinal health besides controlling pathogenic bacteria growth. This is confirmed since  
364 the Vaccine group had a lower percentage of Bacteroidetes phylum and a higher  
365 percentage of Proteobacteria phylum. For future studies, we suggest the association of

366 organic acids or prebiotics for the benefit of the SCFA producers bacteria in chickens  
367 receiving coccidiosis vaccine in order to improve those groups of bacteria.

368

369 **References**

370

371

372 Adedokun, S. A., K. M. Ajuwon, L. F. Romero, and O. Adeola. 2012. Ileal endogenous

373 amino acid losses: Response of broiler chickens to fiber and mild coccidial vaccine

374 challenge. *Poult. Sci.* 91:899–907.

375 Anderson, M. J., T. O. Crist, J. M. Chase, M. Vellend, B. D. Inouye, A. L. Freestone, N.

376 J. Sanders, H. V. Cornell, L. S. Comita, K. F. Davies, S. P. Harrison, N. J. B. Kraft,

377 J. C. Stegen, and N. G. Swenson. 2011. Navigating the multiple meanings of  $\beta$

378 diversity: A roadmap for the practicing ecologist. *Ecol. Lett.* 14:19–28.

379 Arczewska-Włosek, A., S. Świątkiewicz, K. Ognik, and D. Józefiak. 2018. Effect of

380 dietary crude protein level and supplemental herbal extract blend on selected blood

381 variables in broiler chickens vaccinated against coccidiosis. *Animals* 8.

382 Bolyen, E., J. R. et al. Caporaso. 2019. Reproducible, interactive, scalable and

383 extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37:852–857.

384 Callahan, B. J., P. J. McMurdie, M. J. Rosen, A. W. Han, A. J. A. Johnson, and S. P.

385 Holmes. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon

386 data. *Nat. Methods* 13:581–583.

387 Caporaso, J., J. et al. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community

388 sequencing data. *Nat Methods* 7:335–336.

389 Castanon, J. I. R. 2007. History of the use of antibiotic as growth promoters in

390 European poultry feeds. *Poult. Sci.* 86:2466–2471.

391 Cox, L. M., S. et al. 2014. Altering the intestinal microbiota during a critical

392 developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell* 158:705–721.

393 Czerwiński, J., O. Højberg, S. Smulikowska, R. M. Engberg, and A. Mieczkowska.  
394 2012. Effects of sodium butyrate and salinomycin upon intestinal microbiota,  
395 mucosal morphology and performance of broiler chickens. *Arch. Anim. Nutr.*  
396 66:102–116.

397 Dai, P., Z. Yan, S. Ma, Y. Yang, Q. Wang, C. Hou, Y. Wu, Y. Liu, and Q. Diao. 2018.  
398 The Herbicide Glyphosate Negatively Affects Midgut Bacterial Communities and  
399 Survival of Honey Bee during Larvae Reared in Vitro. *J. Agric. Food Chem.*  
400 66:7786–7793.

401 Dalloul, R. A., and H. S. Lillehoj. 2005. Recent Advances in Immunomodulation and  
402 Vaccination Strategies Against Coccidiosis. *Avian Dis.* 49:1–8.

403 Faure, M., D. Moënnoz, F. Montigon, C. Mettraux, D. Breuillé, and O. Ballèvre. 2005.  
404 Dietary Threonine Restriction Specifically Reduces Intestinal Mucin Synthesis in  
405 Rats. *J. Nutr.* 135:486–491.

406 Katoh, K. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based  
407 on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 30:3059–3066.

408 Kogut, M. H. 2013. The gut microbiota and host innate immunity: Regulators of host  
409 metabolism and metabolic diseases in poultry? *J. Appl. Poult. Res.* 22:637–646.

410 Lan, Y., M. W. A. Verstegen, S. Tamminga, and B. A. Williams. 2005. The role of the  
411 commensal gut microbial community in broiler chickens. *Worlds. Poult. Sci. J.*  
412 61:95–104.

413 Lee, K. C., D. Y. Kil, and W. J. Sul. 2017. Cecum microbiome divergence of broiler  
414 chickens by sex and body weight. *J. Microbiol.* 55:939–945.

415 Lehman, R., E. T. Moran, and J. B. Hess. 2009. Response of coccidiostat- versus  
416 vaccination-protected broilers to gelatin inclusion in high and low crude protein  
417 diets. *Poult. Sci.* 88:984–993 Available at <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2008->



418 00469.

419 Li, L., Q. He, Y. Ma, X. Wang, and X. Peng. 2015. Dynamics of microbial community  
420 in a mesophilic anaerobic digester treating food waste: Relationship between  
421 community structure and process stability. *Bioresour. Technol.* 189:113–120  
422 Available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.015>.

423 Li, G. Q., S. Kanu, S. M. Xiao, and F. Y. Xiang. 2005. Responses of chickens  
424 vaccinated with a live attenuated multi-valent ionophore-tolerant *Eimeria* vaccine.  
425 *Vet. Parasitol.* 129:179–186.

426 Liu, T., R. She, K. Wang, H. Bao, Y. Zhang, D. Luo, Y. Hu, Y. Ding, D. Wang, and K.  
427 Peng. 2008. Effects of rabbit *sacculus rotundus* antimicrobial peptides on the  
428 intestinal mucosal immunity in chickens. *Poult. Sci.* 87:250–254.

429 Lozupone, C. A., M. Hamady, S. T. Kelley, and R. Knight. 2007. Quantitative and  
430 qualitative  $\beta$  diversity measures lead to different insights into factors that structure  
431 microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:1576–1585.

432 Lozupone, C., and R. Knight. 2005. UniFrac: A new phylogenetic method for  
433 comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:8228–8235.

434 Lund, M., L. Bjerrum, and K. Pedersen. 2010. Quantification of *Faecalibacterium*  
435 *prausnitzii*- and *Subdoligranulum variabile*-like bacteria in the cecum of chickens  
436 by real-time PCR. *Poult. Sci.* 89:1217–1224.

437 McMurdie, P. J., and S. Holmes. 2013. Phyloseq: An R Package for Reproducible  
438 Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8.

439 Meehan, C. J., and R. G. Beiko. 2014. A phylogenomic view of ecological  
440 specialization in the *lachnospiraceae*, a family of digestive tract-associated  
441 bacteria. *Genome Biol. Evol.* 6:703–713.

442 Metzler-Zebeli, B. U., M. Eklund, and R. Mosenthin. 2009. Impact of osmoregulatory

443 and methyl donor functions of betaine on intestinal health and performance in  
444 poultry. *Worlds. Poult. Sci. J.* 65:419–442.

445 Miller, D. L., N. C. Martin, H. D. Pham, and J. E. Donelson. 1979. Sequence analysis of  
446 two yeast mitochondrial DNA fragments containing the genes for  
447 tRNA(Ser)(UCR) and tRNA(Phe)(UUY). *J. Biol. Chem.* 254:11735–11740.

448 Miller, H. R. P., and Y. Nawa. 1979. *Nippostrongylus brasiliensis*: Intestinal goblet-cell  
449 response in adoptively immunized rats. *Exp. Parasitol.* 47:81–90.

450 Pandit, P. S., M. M. Doyle, K. M. Smart, C. C. W. Young, G. W. Drape, and C. K.  
451 Johnson. 2018. Predicting wildlife reservoirs and global vulnerability to zoonotic  
452 Flaviviruses. *Nat. Commun.* 9:1–10 Available at [http://dx.doi.org/10.1038/s41467-](http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-07896-2)  
453 018-07896-2.

454 Perez-Carbajal, C., D. Caldwell, M. Farnell, K. Stringfellow, S. Pohl, G. Casco, A. Pro-  
455 Martinez, and C. A. Ruiz-Feria. 2010. Immune response of broiler chickens fed  
456 different levels of arginine and vitamin E to a coccidiosis vaccine and *Eimeria*  
457 challenge. *Poult. Sci.* 89:1870–1877.

458 Price, M. N., P. S. Dehal, and A. P. Arkin. 2010. FastTree 2 - Approximately  
459 maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS One* 5.

460 Rautio, M., E. Eerola, M. L. Väisänen-Tunkelrott, D. Molitoris, P. Lawson, M. D.  
461 Collins, and H. Jousimies-Somer. 2003. Reclassification of *Bacteroides putredinis*  
462 (Weinberg et al., 1937) in a new genus *Alistipes* gen. nov., as *Alistipes putredinis*  
463 comb. nov., and description of *Alistipes finegoldii* sp. nov., from human sources.  
464 *Syst. Appl. Microbiol.* 26:182–188.

465 Rinttilä, T., and J. Apajalahti. 2013. Intestinal microbiota and metabolites-Implications  
466 for broiler chicken health and performance. *J. Appl. Poult. Res.* 22:647–658.

467 Singh, K. M., A. K. Tripathi, P. R. Pandya, S. Parnerkar, D. N. Rank, R. K. Kothari, and

468 C. G. Joshi. 2012. Methanogen diversity in the rumen of Indian Surti buffalo  
469 (Bubalus bubalis), assessed by 16S rDNA analysis. *Res. Vet. Sci.* 92:451–455.

470 Sonnenburg, J. L., J. Xu, D. D. Leip, C. H. Chen, B. P. Westover, J. Weatherford, J. D.  
471 Buhler, and J. I. Gordon. 2005. Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted  
472 bacterial symbiont. *Science* (80-. ). 307:1955–1959.

473 Stevenson, D. M., and P. J. Weimer. 2007. Dominance of Prevotella and low abundance  
474 of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative  
475 quantification real-time PCR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75:165–174.

476 Stringfellow, K., D. Caldwell, J. Lee, M. Mohnl, R. Beltran, G. Schatzmayr, S. Fitz-  
477 Coy, C. Broussard, and M. Farnell. 2011. Evaluation of probiotic administration on  
478 the immune response of coccidiosis-vaccinated broilers. *Poult. Sci.* 90:1652–1658.

479 Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, M. A. Mahowald, V. Magrini, E. R. Mardis, and J. I.  
480 Gordon. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for  
481 energy harvest. *Nature* 444:1027–1031.

482 WILCOXON, F. 1946. Individual comparisons of grouped data by ranking methods. *J.*  
483 *Econ. Entomol.* 39:269.

484 Williams, R. B., and L. Gobbi. 2002. Comparison of an attenuated anticoccidial vaccine  
485 and an anticoccidial drug programme in commercial broiler chickens in Italy.  
486 *Avian Pathol.* 31:253–265.

487 Xiao, Y., Y. Xiang, W. Zhou, J. Chen, K. Li, and H. Yang. 2017. Microbial community  
488 mapping in intestinal tract of broiler chicken. *Poult. Sci.* 96:1387–1393.

489 Yegani, M., and D. R. Korver. 2008. Factors affecting intestinal health in poultry. *Poult.*  
490 *Sci.* 87:2052–2063 Available at <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2008-00091>.

491

**Table 1.** Nutritional composition of the experimental diets

Ingredients (%)	Pre-starter	Starter	Grower	Finisher
	1 - 7 d	8 - 21 d	22 - 33 d	34 - 42 d
Soybean meal	37.66	34.84	31.86	27.77
Maize	56.64	58.91	61.21	65.66
Soybean oil	1.38	2.32	3.45	3.42
L-Lysine	0.30	0.33	0.24	0.27
DL-Methionine	0.36	0.31	0.28	0.27
L-Treonine	0.11	0.07	0.06	0.06
NaCl	0.52	0.5	0.47	0.46
Limestone	0.91	0.94	0.88	0.8
Phosphate	1.89	1.55	1.32	1.11
Choline	0.05	0.05	0.05	0.05
Min Premix <sup>1</sup>	0.10	0.10	0.10	0.10
Vit- Premix <sup>2</sup>	0.034	0.034	0.034	0.034
Salinomycin or Kaolin <sup>3</sup>	0.05	0.05	0.05	x
Nutrient composition, calculated				
ME (kcal/kg)	2960	3050	3150	3200
CP, %	22.40	21.21	19.90	18.400
Ca, %	0.920	0.841	0.758	0.663
Available P, %	0.470	0.401	0.354	0.309
Na, %	0.220	0.21	0.200	0.195
Digestible Arg, %	1.393	1.308	1.221	1.145
Digestible Lys, %	1.324	1.275	1.131	1.060
Digestible Met %	0.651	0.588	0.552	0.525
Digestible Met + Cys, %	0.953	0.876	0.826	0.774
Digestible Trp, %	0.257	0.241	0.225	0.211
Digestible Thr, %	0.861	0.791	0.735	0.689

<sup>1</sup> Mineral premix (per kg/feed) = cobalt 200 mg, 88,000 mg manganese, 95,535 mg zinc, 64,715 mg iron, 15,000 mg copper, 1795 mg iodine, 200 mg selenium.

<sup>2</sup> Vitamin premix (per kg/feed) = 34,520,000 IU vitamin A, 7,200,000 IU vitamin D3, 90,000 IU vitamin E, 8,600 mg vitamin K, 6,700 mg vitamin B1, 20,000 mg vitamin B2, 9000 mg vitamin B6, 72,000 mcg vitamin B12, 34,000 mg pantothenic acid, 140,000 mg niacin, 2,800 mg folic acid, and 240 mg biotin.

<sup>3</sup> Kaolin is considered to have zero nutrient contribution.

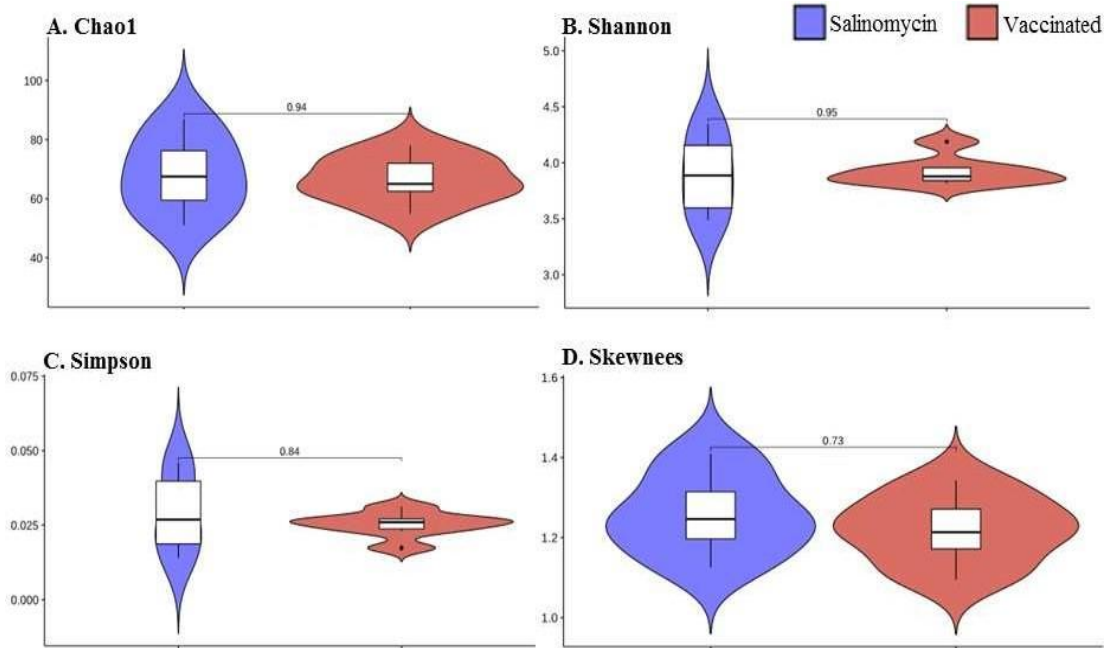
**Table 2.** Performance of broilers vaccinated for coccidiosis or supplemented with salinomycin in diets to 1 – 42 days

<b>Variables</b>	<b>Treatments</b>		<b>P Value<sup>1</sup></b>	<b>SE<sup>2</sup></b>
	<i>Salinomycin</i>	<i>Vaccinated</i>		
Body Weight (g)	3213	3090	0.012	42.7
Body Weight Gain (g)	3165	3042	0.050	32.3
Feed Intake (g)	5003	4995	0.660	42.8
Feed Conversion Rate (g/g)	1.58	1.64	0.007	0.01

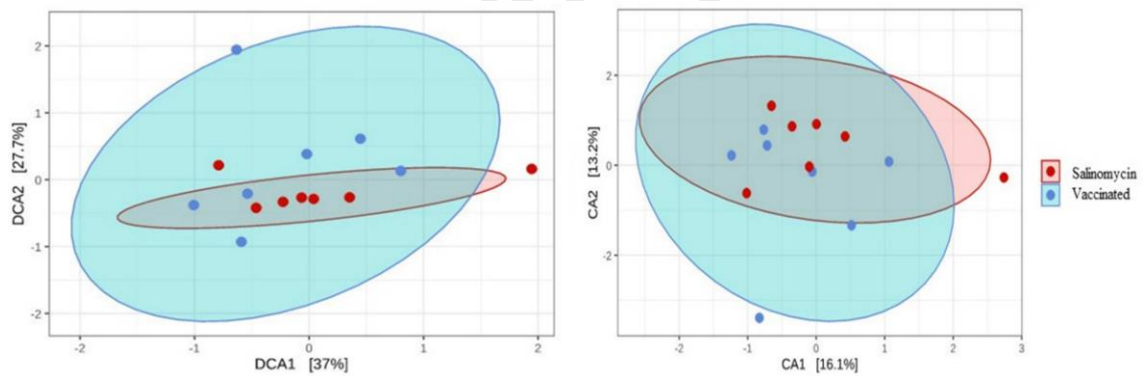
<sup>1</sup> For the effects of treatments salinomycin or vaccinated

<sup>2</sup> SEM = standard error of the mean

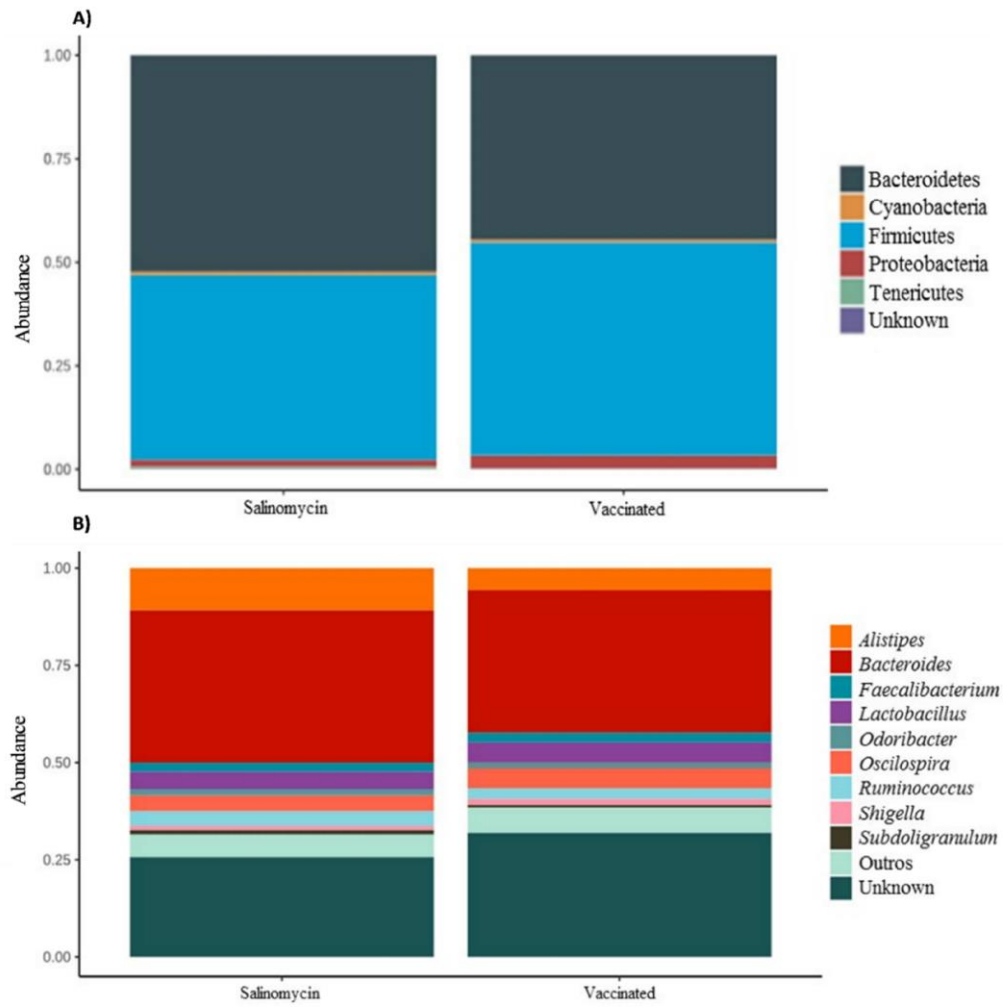
Journal Pre-proof



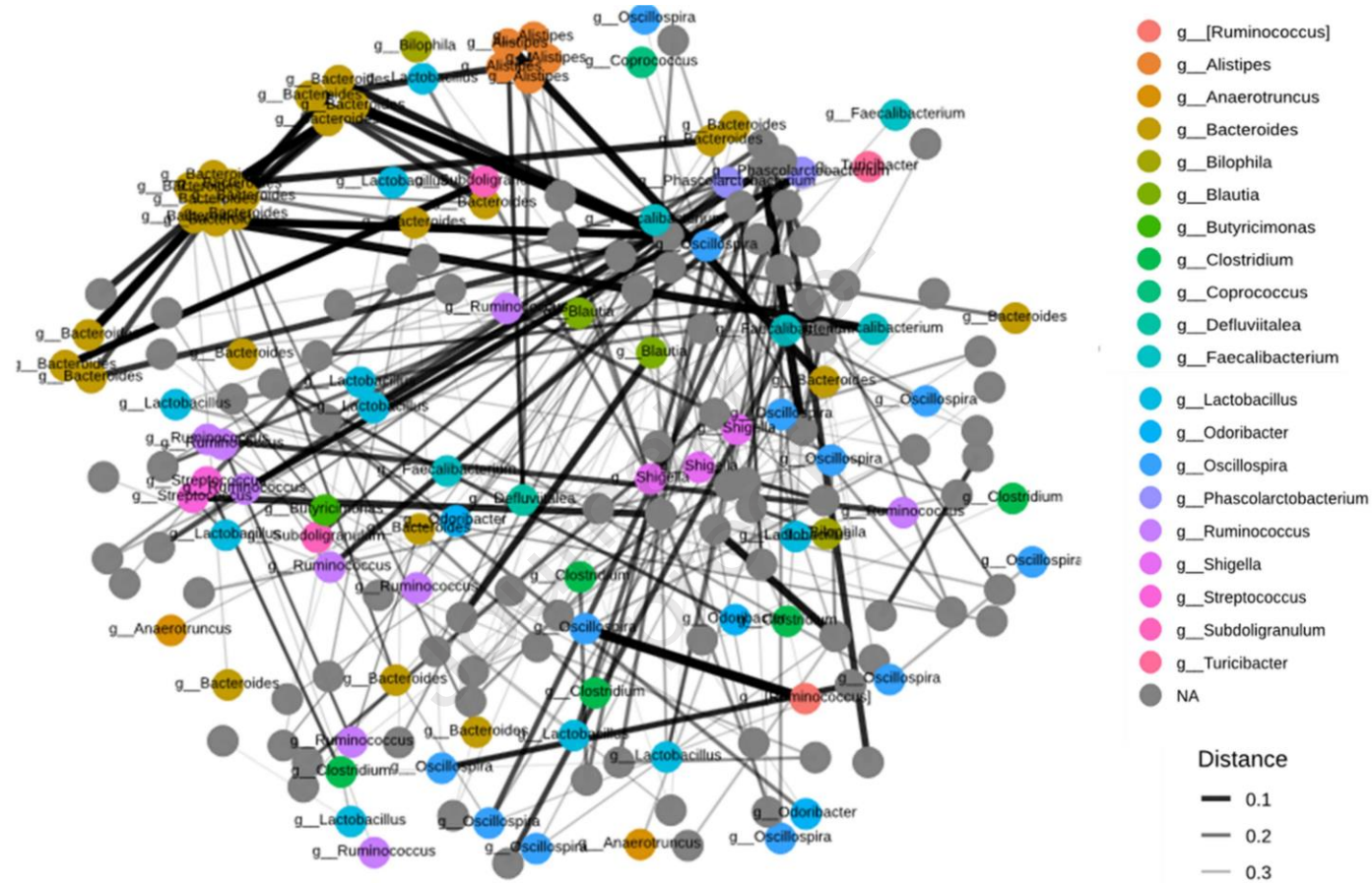
**Figure 1.** Analysis of Alpha – diversity in the cecum of broiler chicken treated with salinomycin or vaccinated



**Figure 2.** First two dimensions of the Detrended Correspondence Analysis (DCA) and Canonical Correspondence Analysis (CA) and the amount of variation explained are shown. Each circle represents the populations, and colors represent the groups



**Figure 3.** Relative abundances at the phylum (A) and genus (B) level of the main bacteria found in the cecum of broiler chicken treated with salinomycin or vaccinated



**Figure 4.** Total relationship between genus found in the cecum of broilers



1  
2  
3  
4  
5

6 To the Editorial Board of

7 Poultry Science Dear Editor,

8 Please find enclosed the manuscript review of the manuscript “**Changes in the ceca**  
9 **microbiota of broilers vaccinated for coccidiosis or supplemented with salinomycin**”10 The manuscript is original, has not been published before, and is not being  
11 considered for publication elsewhere in its final form neither in printed nor in electronic  
12 format and does not present any kind of conflict of interests.13 We wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this  
14 publication and there has been no significant financial support for this work that could have  
15 influenced its outcome. We confirm that we have given due consideration to the protection  
16 of intellectual property associated with this work and that there are no impediments to  
17 publication, including the timing of publication, with respect to intellectual property. In so  
18 doing we confirm that we have followed the regulations of our institutions concerning  
19 intellectual property.20  
21  
22  
23  
24The corresponding author signs this document on behalf of  
all authors.

---

Catiane Orso

Corresponding author

25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35

36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88

### **CAPÍTULO III**

\* Artigo científico nas normas da revista *Poultry Science*

89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122

*COCCIDIOSIS, ANTICOCCIDIAL AND VACCINE*

**Effect of the live *Eimeria* vaccination or salinomycin on growth and immune status in broiler chickens received inclusion in-feed gelatin and vitamin E**

C. Orso<sup>1</sup>, B. L. Cony<sup>1</sup>, J. P. Silva<sup>2</sup>, J. Frazzon<sup>2</sup>, A. P. G. Frazzon<sup>3</sup>, I. Andretta<sup>1</sup>,  
A.M.L. Ribeiro<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Animal Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup> Department of Microbiology, Porto Alegre, Brazil

*\* Corresponding author:*

Andréa Machado Leal Ribeiro  
Laboratório de Ensino Zootécnico  
Avenida Bento Gonçalves 9600, Porto Alegre, RS, Brasil.  
CEP: 91540-000  
Telefone: +55 51 33086854  
Fax: 55 55 3221 4175  
e-mail: [aribeiro@ufrgs.br](mailto:aribeiro@ufrgs.br)

*Scientific Section*

*Immunology, Health and Disease*

123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147

**ABSTRACT** Experimentation determined if gelatin and vitamin E supplementation would relieve the impaired performance of broilers vaccinated for coccidiosis. Male Cobb broilers were fed with gelatin, when employed, was included at 2% to improve the levels of proline and glycine in the diet, also vitamin E at 70 mg/kg of feed. Half of the chicks were vaccinated via water (live oocysts), while the other half received medication (salinomycin) in the feed until 35 days of age. The effects of coccidiosis vaccine on performance and mRNA levels of genes involved in mucin synthesis, cytokines, trefoil family factor-2 (TFF2) and metabolic processes (CD36) in the jejunum of broilers were measured. Vaccination negatively affected performance in the first 21 days; however, inclusion of gelatin and vitamin E reduced the negative response of the vaccination, also providing improvement broilers receiving the coccidiostat ( $P<0.05$ ). In the last 2 weeks, supplemented vaccinated birds experienced better body weight gain than birds without gelatin and vitamin E ( $P<0.05$ ). Vaccinated chickens had decreased body weight, lower antiinflammatory expression and higher inflammatory cytokines expression, high mucin 2 expression and TFF2 compared with salinomycin-fed broilers. Transcripts for IL-1B, IFN- $\gamma$ , MUC2, TFF2 were decreased while mRNAs for IL-4 and IL-10 were increased in supplemented broilers compared to vaccinated ( $P<0.05$ ). In conclusion, vaccination against avian coccidiosis may be more increased pro-inflammatory immune status, increased mucins expression compared with dietary salinomycin. These events can be contributing for lower performance. Vitamin E and gelatin can minimize the negative immune effects and promote the same performance of animals treated with salinomycin.

148

149

**Keywords:** Aminoacids, Broilers, Coccidiosis, Nutrients, Vaccine, VitaminE

150

151

152

153

154

## INTRODUCTION

155

156

A healthy gut is fundamental for optimum performance, better feed efficiency, and overall health of poultry. The healthy gut can be compromised by coccidiosis, a parasitic disease that results in intestinal infection. *Eimeria* infection of broiler chickens can be controlled by vaccination with live parasites or by coccidiostat drugs (Williams, 2005; Shirley and Lillehoj, 2012). Mass administration of coccidiostat drugs has long been employed as a highly effective method control, however drug resistance is widespread, and we have pressure demanding reduced use in livestock production (Antonissen et al., 2016; Karavolias et al., 2018).

157

158

159

160

161

162

163

164

165

Vaccination for coccidiosis may be an alternative to anticoccidials.

166

However, vaccine has been shown to adversely affect performance broilers compared to those given a dietary anticoccidial (Lehman et al., 2009). The reduced performance because of the vaccines is associated with low infections (Lee et al., 2011) necessary for induce the immunity, results in a decrease in the absorbent intestinal surface area (Lehman et al., 2009). In response to the vaccination, the mucosa intestinal increase the production mucin (Miller and Narva, 1979) which is rich in amino acids such as glycine, serine, proline and mainly threonine (Moran, 2008). Further than, mucin stimulation a increase production of proinflammatory cytokines the pyrogenic effect of the vaccine (fever), increasis 10 to 15% basal metabolic rate for every 1°C rise in body temperature. These metabolic changes,

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176 mediated by cytokines, cause glucose and aminoacid mobilization in peripheral  
177 tissues and directed to the sites of generation of the immune response (Fernandes  
178 et al., 2013).

179 The objective this study is through nutritional strategies decrease the  
180 effects of the vaccine against coccidiosis and prevent the decrease in performance  
181 using ingredients that provide important nutrients for the recovery from adverse  
182 effects. Gelatin is an ingredient that has a substantial content of non-essential  
183 amino acids (Boomgaardt and Baker, 1972) and can be an alternative to supply  
184 required in greater quantities to produce mucin and recovery of the intestinal  
185 epithelium. To control the inflammatory effects, we can mention the use of non-  
186 steroidal anti-inflammatory additive, such as vitamin E (Silva and Penna, 2012).  
187 Vitamin E supplementation preserve immune responses in individuals exposed to  
188 free radicals (Fialkow et al., 2007) and minimizes pro-inflammatory effects (Jiang,  
189 2014). Contributing through nutrition for the development of immunity,  
190 reconstruction of the intestinal epithelium and maintenance of high performance  
191 is justified. To investigate the questions posed above, an experiment was conduct  
192 to evaluate the use of nutrients (amino acids and vitamin E) in the feed that reduce  
193 the impact of the coccidiosis vaccine on the intestinal epithelium and contribute to  
194 the recovery of broilers from the vaccine effects.

## 195 **MATERIAL AND METHODS**

196  
197 All procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Use from the  
198 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil (number 35670).

### 199 ***Broilers husbandry***

200 A total of 560 1-day-old, male chicks (Cobb 500 ®) were vaccinated  
201 according to the vaccine schedule at the hatchery (Languiru Group, Brazil). Chicks

202 had 48 g and were randomly placed into 56 floor pens (10 birds per pen) respecting  
203 a variation between the replicates of  $\pm 2.5\%$  of total body weight. Pens were  
204 covered with wood shavings used previously and were equipped with a tube feeder  
205 and nipple drinkers. Environmental temperature management to maintain chickens  
206 in thermoneutral conditions during all growth stages were performed using air  
207 conditioning, fans and exhaust fans. Birds had *ad libitum* access to water and mash  
208 feeds.

209

### 210 ***Experimental design, Diets and Experimental Procedures***

211 Broilers were distributed in eight experimental treatments with 7 replicates  
212 (10 birds/each) in a completely randomized design. Half of the birds were  
213 vaccinated and the rest were protected with a dietary coccidiostat. Half of the  
214 chicks (four groups) received a diet containing 60 mg/kg of Salinomycin since the  
215 first day until 35 days of age. The other half were vaccinated (the other four  
216 groups), via water, against coccidiosis with a live attenuated vaccine (LIVACOX,  
217 30 - 50 thousand oocysts of each attenuated strain of *E. tenella*, *E. acervulina* and  
218 *E. maxima*) on the first day of life. Two groups (Coccidiostat *vs.* Vaccine) received  
219 the addition of 70 mg of the kg/feed the vitamin E or 2% gelatin inclusion in the  
220 diets, or both associated. Control group received 35 mg of vit E and did not receive  
221 gelatin supplementation. The lower level of dietary vitamin E (35 ppm) used in  
222 this study was chosen to approximate concentrations found in commercial starter  
223 rations. The experimental treatments was described in the Table 1. The feeding  
224 program used was diet pre-starter (1–7 days), starter (7–21 days), grower (21–35  
225 days) and finisher (35–42 days). The diets formulated according to Rostagno et al.

226 (2011), consisted of corn and soybean meal, as main ingredients, and were  
227 isonutritive (Table 2).

228 Body weight (BW) averaged by pen was recorded weekly. Body weight  
229 gain (BWG), feed intake (FI), and feed conversion ratio corrected for the weight  
230 of dead birds (FCR) were determined by feeding phase. Mortality was recorded  
231 daily. At 28 days of age, 1 chicken per replicate was euthanized for the collection  
232 of 5 cm of intestinal tissue located in the jejunum/ileal junction. Immediately after  
233 the collect the samples were frozen in liquid nitrogen and stored at - 80°C.

234

### 235 ***Gene expression***

236 Based on differential expression levels of genes we tried to characterize  
237 the changes in the intestinal immune status and the choose a panel of genes selected  
238 to further investigate shown on Table 3. Trizol® reagent (Invitrogen, Carlsbad,  
239 CA, USA) was used for RNA extraction according to manufacturer  
240 recommendations, 1 mL/100 mg tissue. Tissue was triturated using TissueLyser  
241 (Qiagen Retsch MM300 TissueLyser) (tissue + Trizol) to complete dissociation. It  
242 was added 200 µL chloroform and homogenized by hand for 1 min. The upper  
243 aqueous phase was obtained by centrifuging the homogenate at 12,000 g (320R  
244 Refrigerated bench centrifuge; Hettich, Tuttlingen, Germany) for 15 min at 4°C.  
245 Liquid phase was collected and transferred to clean tube with 500 µL isopropanol  
246 in each tube. Solution was incubated at room temperature for 10 min and after  
247 being centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C. Supernatant was discarded, and  
248 precipitate was washed with 950 uL 75% ethanol. Pellet was dried for 15 min and  
249 material resuspended in RNase-free ultrapure water. The quality of RNA was  
250 determined by (NanoDrop-1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and de



251 values OD<sub>260/280</sub> of all samples were limited to the range of 1.9 to 2.0. No sample  
252 was excluded based on this. The integrity of the (mRNA) total RNA was  
253 determined using ultraviolet spectrophotometry and agarose gel electrophoresis.  
254 All samples had clear 28S and 18S ribosomal RNA bands, and no sample was  
255 excluded. The RNA samples were stored at -80°C until required for cDNA  
256 synthesis. The total concentration of RNA was determined by Qubit (Qubit 3.0  
257 Fluorometer) and after 1 µg was treated with Deoxyribonuclease I (Fermentas Life  
258 Sciences). O RNA treated was used for reaction of Reverse transcription (cDNA)  
259 using the high GoScript™ Reverse Transcription Mix, Oligo(dT) (Promega),  
260 following the manufacturer's protocol. The cDNA was diluted 1:100 in nuclease-  
261 free water and stored at -20°C for subsequently was used for gene expression  
262 profiling.

263 qRT-PCR primers were designed using Primer-BLAST on the NCBI  
264 website and the GAPDH was used as reference genes on all PCR plates and genes  
265 tested. qRT PCR was performed using an StepOnePlus™ Real-Time PCR System  
266 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with a PowerUP SYBR Green PCR  
267 Master Mix (Thermo Fisher Scientific). The PCR mixture contained 5 µL  
268 PowerUP SYBR Green Supermix, 0.5 µL (10 mmol) of each primer, and 1 µL of  
269 cDNA, along with add H<sub>2</sub>O for a total volume of 10 µL. The procedure was as  
270 follows: UDG activation 50°C for 2 min, Dual-Lock DNA polymerase 95°C for 2  
271 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and  
272 annealing/extension for 1 min at 60°C. The individual measurements were  
273 performed in triplicate, and the relative gene expression was calculated using the  
274  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method.

275 ***Statistical Analysis***

276 All statistical analyses for gene expression were performed on transformed  
277 GAPDH-normalized data. The SAS 9.3 Software was used to perform the contrasts  
278 analyses. The partitioning of growth rate reduction under vaccine was calculated  
279 as described by Pastorelli et al. (2012). In brief, the relationship between feed  
280 intake ( $\Delta$ FI) and weight gain ( $\Delta$ WG) of vaccinated birds relative to medicated  
281 birds (expressed as percentage) was analysed using linear regression:  $\Delta$ BWG =  $\alpha$   
282 +  $\Delta$ FI. The analysis was carried out using the REG procedure in SAS. The intercept  
283 ( $\alpha$ ) represents  $\Delta$ BWG related to changes in maintenance, which is not associated  
284 with  $\Delta$ FI. The coefficients represent the extent of  $\Delta$ BWG associated with  $\Delta$ FI.

## 285 RESULTS

286  
287 The objective of this experiment was to characterize if the magnitude of  
288 coccidiosis vaccination at first day of hatch influences growth performance and  
289 immune response in floor-reared broilers when received better support nutrition  
290 with amino acids and vitamin E.

### 291 *Performance*

292 Average mortality was 2.86% and there was no difference between groups.  
293 During the first 3 weeks, temporary infection from vaccination created more  
294 stress than anticoccidial medication, evidenced by reduced BWG and lower  
295 BW at 1 to 21 days ( $P < 0.05$ ) (Table 4). Lower final BW and poor FCR of birds  
296 vaccinated was observed at 42 days ( $P < 0.05$ ), however, no differences were  
297 observed for BWG among vaccinated or salinomycin birds of 22 to 42 days  
298 ( $P > 0.05$ ). No statistical differences were observed between vaccinated or  
299 anticoccidial treated for FI ( $P > 0.05$ ).

300 Gelatin or vitamin E (or both associated) improved BWG and BW from 1  
301 to 21 d when using a coccidiostat for protection ( $P < 0.05$ ). The addition of gelatin

302 to the poultry diet or gelatin associated with vitamin E improved FCR between 1  
303 to 21 days ( $P<0.05$ ), however, nonpositive effect of the individual addition was  
304 observed in performance from 1 to 42 d, only when both were utilized together.  
305 Although the addition of gelatin or vitamin E had no effect on live performance of  
306 birds receiving coccidiostat from 1 to 42 days ( $P>0.05$ ), the converse occurred  
307 when associated both substances, being advantageous the addition of gelatin and  
308 vitamin E for higher final BW, better BWG and FCR ( $P<0.05$ ). Any improvement  
309 from gelatin or vitamin E when using a coccidiostat for protection was not evident  
310 in FI and live performance between 22 to 42 d ( $P>0.05$ ) (Table 5).

311 To minimize the impact of the vaccine on live performance only with  
312 gelatin or vitamin E was not enough in the period from 1 to 21 days, as well as,  
313 from 1 to 42 days ( $P>0.05$ ). Vitamin E combined with gelatin improved the final  
314 BW of the broilers at 42d compare to the vaccine group without nutritional  
315 adjustment ( $P<0.05$ ). This higher final BW may be a reflex of the tendence  
316 improvement in dietary conversion of the 1 to 21 days ( $P = 0.07$ ). Gelatin  
317 inclusion improved live performance of vaccinated birds and permitted the  
318 broilers to recuperate better from the effects of the vaccine in the period of 22 to  
319 42 days showing BWG and FCR in the final phase ( $P<0.05$ ).

320 The correlation between variation ( $\Delta$ ) in weight gain and feed intake  
321 caused by vaccination was  $R^2=0.509$  ( $P<0.05$ ) (Figure 1). The variation in weight  
322 gain ( $\Delta$ WG) showed a linear relationship with variation in feed intake ( $\Delta$ FI). The  
323 intercepts of the equations were different from zero and negative. The partition of  
324 the effects on  $\Delta$ WG corrected for the average  $\Delta$ FI is presented in Figure 1.

### 325 **Intestinal genes mRNA levels**

326 The levels of inflamamatory intestinal genes transcripts for IL-1 $\beta$  (Pro-

327 inflammatory) and IFN-  $\gamma$  (T helper 1) were increased in the vaccinated chickens  
328 compared with salinomycin-fed chickens at day 28 ( $P<0.05$ ). Transcript levels of  
329 the IL-1 $\beta$  e IFN-  $\gamma$  in vaccinated chickens receiving gelatin and vitamin E were  
330 less ( $P<0.05$ ), while TNFSF15, IL-17F, IL-2 and IL-12 transcripts levels do not  
331 show differences (Fig. 2, 3). When evaluated transcripts levels for IL-4 and IL-10  
332 antiinflammatory cytokines, it has been observed decrease in vaccinated broilers  
333 compared with salinomycin-fed chickens ( $P<0.05$ ). IL- 10 transcript levels in  
334 immunized chickens were greater when fed with diets supplemented with vitamin  
335 E and gelatin ( $P<0.05$ ) (Fig. 4).

336 Intestinal MUC2 gene transcription was increased in the vaccinated  
337 without versus unvaccinated broilers ( $P<0.05$ ). Broilers chickens vaccinated  
338 receiving the inclusion of vitamin E associated with gelatin in the diet had lower  
339 expression MUC2 gene transcription ( $P<0.05$ ) compare to vaccinated. No  
340 difference between treatments was observed between for MUC13 and MUC5ac  
341 ( $P>0.05$ ) (Fig. 5). Similar to what was observed for MUC2, TFF2 transcription  
342 was higher in the vaccinated chicks ( $P<0.05$ ) in relation salinomycin, also when  
343 compare to supplemented with vitamin E and gelatin. iNOS and CD36  
344 transcription was not significantly affected by either diet supplementation and  
345 treatment by vaccination or salinomycin ( $P>0.05$ ) (Fig. 5).

## 346 **DISCUSSION**

347  
348  
349 Vaccination for coccidiosis negatively influenced the live performance of  
350 broilers compared with control through coccidiostats. The observed increase of  
351 performance at day 21 and 42 in medicated versus vaccinated chickens consistent  
352 with the study by Lehman et al. (2009) who reported that broilers immunized with  
353 Paracox® vaccine had poor performance during the first 3 weeks post-hatch

354 compared with chickens that received the antibiotic growth promoter. It may be  
355 possible that antibiotic ionophores promote early weight gain while the severe  
356 effects of vaccination are manifested in this period. Niewold (2007) hypothesized  
357 that antibiotics may be growth permitting by inhibiting the production and  
358 excretion of cytokines by immune cells. Cytokine release would then lead to an  
359 acute phase response leading to loss of appetite and muscle tissue catabolism  
360 (Niewold, 2007). Certainly, inflammation leads to performance decreases  
361 (Humphrey and Klasing, 2003), but equally may act by shifting the microbiota  
362 composition towards one that is less capable of evoking an inflammatory response.  
363 Antibiotics could also simply lower the total microbial load, leading to less  
364 inflammation and lower energetic cost for the animal.

365 Coccidiosis vaccines can induce a mild transient form of coccidiosis,  
366 usually occurring between 14 and 28 d post-hatch, which can impair broiler  
367 performance (Lehman et al., 2009). This transient form of coccidiosis that usually  
368 occurs in the second cycle of oocysts, around 21 days, reflects a low performance  
369 more significant at this phase. Silva et al. (2009) similarly reported a vaccine-  
370 induced reduction in BWG at 21 d of age but observed no differences in BWG  
371 between vaccinated and non-vaccinated birds at final phase (36 d of age). One of  
372 the negative responses often associated with a coccidiosis vaccination is a decline  
373 in body weight gain and in the current study we observed this at 21 d. This  
374 suggests that the chicks were in fact experiencing a low level of infection at the  
375 end of the approximate second coccidiosis shedding cycle (1-21 d). Lower body  
376 weight was observed at 42 days of the birds vaccinated, however, was observed  
377 the same BWG between the groups of 22 to 42 days. As the poultry cycle is short,  
378 despite possible compensatory gain at this phase, it was not enough for chickens

379 to regain the same final BW as broilers receiving anticoccidials. The high in body  
380 temperature can increase the energy demand and lead to the lowest observed body  
381 weight.

382 Experimental treatments with these alternative formulations, amino acids  
383 and vitamin E, improved broilers performance at 21 days when were treated with  
384 salinomycin.

385 This suggests that despite the good support of salinomycin, conditionally essential  
386 amino acids can be important factors in the performance of animals even when  
387 broilers are not challenged by vaccine. Also, Vitamin E can protecting cells against  
388 free radical oxidative processes (Tappel, 1972) and can also function as an  
389 immunomodulator (Boa-Amponsem et al., 2000). The negative effects of vaccine  
390 were more pronounced until 21 days of age and support with gelatin and vitamin  
391 E reflected in better BWG and FCR in the period of 22 to 42 days. The amino acid  
392 supply, the antioxidant and immunomulator effect of vitamin E seems to allow  
393 birds to recover better from vaccine effects in the final period of raising. Increasing  
394 amino acid levels and using a non-steroidal antioxidant with anti-inflammatory  
395 functions such as vitamin E can minimize the lower performance of vaccinated  
396 birds.

397 The intercepts from vaccine groups were negative, suggesting that when  
398  $\Delta FI$  was not affected, the fraction due to change in maintenance contributing to  
399  $\Delta BWG$  was negative and independent of the consume. Therefore, under vaccine  
400 infection, broilers would have an increased maintenance requirement, and thus a  
401 lower BWG. In addition, it was noticed that the fraction of change in maintenance  
402 for the vacinne group was  $-1.23\%$  of the total decreased BWG (Fig. 1b).

403 Intestinal gene transcripts for IL- $\beta$  and IFN- $\gamma$  were increased, whereas IL-

404 4 and IL-10 transcripts were decreased in immunized chickens compared with  
405 salinomycin-fed birds at 28 days. Salinomycin may activate anti-inflammatory  
406 pathways in the avian gut, as evidenced by increased transcription of the counter-  
407 regulatory cytokines IL-4 and IL-10 compared with cocci-vaccine. Intestinal  
408 inflammation can be contribute to the reductions in performance experienced by  
409 coccidiosis-vaccinated broilers. Inflammation is induced by pro-inflammatory  
410 cytokines released by antigen-recognizing cells, including IL-1 $\beta$ . The relative  
411 effects of coccidiosis vaccination on intestinal levels of proinflammatory cytokine  
412 transcript, may reflect the heightened inflammatory status induced by the live  
413 parasites.

414 It was observed beneficial effect of apport nutritional with gelatin and  
415 vitamin E in the reduction of inflammatory state, broilers had lower IL-1 $\beta$  and  
416 IFN- $\gamma$  intestinal levels of cytokine transcript. Attenuated parasite need invading  
417 the gut epithelium to generate immunity, causing an inflammatory response,  
418 replication and producing oocysts. Vitamin E it is absorbed in its unesterified  
419 form through the intestinal epithelium and is readily incorporated into cellular  
420 membranes where it acts as an antiinflammatory immunomodulator in chickens  
421 (Boa-Amponsem et al., 2000). This effect can be seen in the lower expression of  
422 the IFN- $\gamma$  cytokine in the groups treated with vitamin E. The beneficial effects of  
423 vitamin E may be due to the ability of its phosphorylated metabolite inflammation  
424 and immune system disorders (Azzi et al.,2016).

425 Coccidiosis vaccination skews the immune balance toward a pro-  
426 inflammatory/Th1 state, while dietary salinomycin favors an anti-inflammatory  
427 status. Infection with *Eimeria* protozoa up-regulates the expression of pro-  
428 inflammatory cytokines while decreased the expression of anti-inflammatory

429 cytokines (Engberg et al., 2000; Lillehoj et al., 2004, 2007; Lee et al., 2011). The  
430 low levels of exposure to coccidia vaccine decreased the sensitivity of detecting  
431 cytokine expression and is not observed the IL-6 and IL-13 expression (data do  
432 not showed). It was not observed increased of the iNOS expression between the  
433 groups at 28 d and this can be related to the time when the acute phase of infection  
434 occurs, between 4 and 7 days post vaccination. The acute stage of  
435 infection/vaccination occur between 4- and 7-days (Allen and Fetterer, 2002). In  
436 the current experiment, coccidiosis vaccination did not increase nitric oxide in the  
437 intestinal mucosa, which is in agreement with the findings of Perez-Carbajal et al.  
438 (2010). Nonetheless, it appears that the transient coccidiosis elicited by  
439 vaccination does not induce nitric oxide production as do more severe challenges.

440 Increased mucin production is a reflection of the intestinal inflammatory  
441 process caused by vaccine. Supplementation with vitamin E and gelatin provided  
442 better recovery of the intestinal epithelium, explained by the lower production of  
443 mucin as a better response to infection generated by the vaccine. The vaccinated  
444 group also showed higher expressions than the group treated with salinomycin.  
445 After a coccidiosis infection, by oocysts or vaccine, broilers increase secretory  
446 mucin (MUC2) production and need to regenerate the the surface of the damaged  
447 intestinal enterocytes. A coccidiosis infection has been shown to increase mucin  
448 production through inflammatory cytokine production leading to increased  
449 mucogenesis (Collier et al., 2008).

450 Mucin is composed of a high amounts of nonessential amino acids, and  
451 although the broilers is able to synthesize may not be rapid enough to satisfy high  
452 demands after vaccination (Lehman et al., 2009). It was provide these nonessential  
453 amino acids in a greater proportion to the broilers in the form of gelatin as a means



454 to enhance recovery from coccidial vaccination. It was observed increased levels  
455 of MUC2 intestinal gene transcripts at the vaccinated group.

456           Although it is not clear which amino acids provide the benefit during the  
457 vaccine challenge, proline and glycine are two amino acids that are extremely  
458 important to the improved performance. Glycine is readily synthesized by the  
459 chick, but this synthesis may not be rapid enough to satisfy the needs for fast tissue  
460 growth (Jiang et al., 2005; Corzo et al., 2004; Dean et al., 2006), especially after  
461 tissue damage caused by infection. Though the importance of these two  
462 conditionally nonessential amino acids is evident, the requirement for these under  
463 varying conditions is still not fully known. Forder et al. (2012) explained that,  
464 mucosa deteriorated as a result of the coccidiosis challenge, the expression of  
465 MUC2 becomes impeded, which could prevent replenishment of the mucus layer  
466 and increase the chance of new infections and damage. However, the vaccine did  
467 not cause a sufficient degree of lesion to prevent replenishment of the mucus layer  
468 and this group showed greater expressions of MUC2 in relation to the salinomycin  
469 group and also in relation to the vaccinated group that received gelatin and vitamin  
470 E supplementation. MUC2 has been shown to have NF- $\kappa$ B binding sites within the  
471 promoter region which is upregulated in the intestinal tract during inflammation  
472 (Kim and Ho, 2010). This suggests that a low level infection is enough to stimulate  
473 the physical gut barrier function through the upregulation of MUC2. Trefoil family  
474 factor genes (TFF2) to interact cooperatively with mucin to maintain barrier  
475 function (Suzuki et al., 2006) and play an important role in the repair of damaged  
476 intestinal mucosa, with their expression increased after mucosal damage (Kurt-  
477 Jones et al., 2007). TFF2 mRNA transcripts were significantly increased by  
478 vaccine and barrier function was reestablished by vitamin and gelatin.

479           The relative effects of coccidiosis vaccination on intestinal levels of  
480 cytokine transcript, may reflect the heightened inflammatory status. As seen, the  
481 weight gain depression occurred between days 1 to 21 post vaccination, using  
482 better nutritional support can be a good alternative to reduce the negative effect of  
483 vaccination on bird's performance. Coccidiosis vaccines can be a good alternative  
484 to prevent coccidiosis in broiler flocks but can induce low damage to the intestinal  
485 epithelium necessary to induce immune response and this impair live performance,  
486 also increase in the metabolic cost associated with the activation of the immune  
487 system. In conclusion, results reported herein indicate that coccidiosis vaccination  
488 had significant adverse impact on overall BW, BWG and FCR of vaccinated birds,  
489 although overall FI was not impaired by vaccination. It can be concluded that,  
490 when given diets with adequate aminoacids, coccidiosis-vaccinated broilers  
491 benefit from additional aminoacids, especially proline and glycine, provide by  
492 gelatin.

493

494

## REFERENCES

495

Antonissen G, Eeckhaut V, Van Driessche K, Onrust L, Haesebrouck F, Ducatelle R,

496

Moore, R J. and F. V. Immerseel. 2016. Microbial shifts associated with necrotic

497

enteritis. Avian Pathol 45:308–12.

498

Allen, P. C., and R. H. Fetterer. 2002. Recent advances in biology and immunobiology

499

of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian

500

parasites of poultry. Clin. Micro. Rev. 15:58-65.

501

Azzi, A.; Meydani, S.N.; Meydani, M.; Zingg, J.M. 2016. The rise, the fall and the

502

renaissance of vitamin E. Arch. Biochem. Biophys. 595:100–108.

503

Boomgaardt, J. and D.H. Baker. (1972). Sequence of limiting amino acids in gelatin

504 for the growing chick. *Poult. Sci.* 51: 1650-1655.

505 Boa-Amponsem, K., S. E. H. Proce, M. Picard, P. A. Geraert, and P. B. Siegel. 2000.  
506 Vitamin E and the immune responses of broiler pureline chickens. *Poult. Sci.*  
507 79:466–470.

508 Collier C.T., Hofacre, C.L., Payne, A. M., Anderson, D. B., Kaiser, P., Mackie, R. I., Gaskins,  
509 H. R. 2008. *Coccidia*-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis  
510 by supporting *Clostridium perfringens* growth. *Veterinary Immunology*  
511 *Immunopathology*.122:104-115.

512 Corzo, A., Kidd, M.T., Burnham, D. J. and B. J. Ker. 2004. Dietary glycine needs of broiler  
513 chicks. *Poult. Sci.*83:1382–1384.

514 Dean, D. W., Bidner, T. D. and L. L. Southern. 2206. Glycine supplementation to low  
515 crude protein, amino acid-supplemented diets supports optimal performance of  
516 broiler chicks. *Poult Sci.*85:288–296.

517 Engberg, R.M. T. D. Leser, T. D. and B. B. Jensen. 2000. Effect of zinc bacitracin  
518 and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers.  
519 *Poult. Sci.* 79:1311–1319.

520 Fernandes, J. I. M., BortoluzziI, C., KosmannI, R. C., Gottardo, E. T., Fernandes, N.  
521 L.M. 2013. Suplementação dietética de levedura de cerveja e de minerais  
522 orgânicos sobre o desempenho e resposta imune em frangos de corte desafiados  
523 com a vacina de coccidiose. *Ciência Rural*, 4:1496-1502.

524 Fialkow, L., Wang, Y., Downey, G. P. 2007. Reactive oxygen and nitrogen species as  
525 signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Rad. Bio and Med.*  
526 42:153-64.

527 Forder, R. E. A. et al. Quantitative analyses of genes associated with mucin synthesis  
528 of broiler chickens with induced necrotic enteritis. *Poultry Science*. v.91, p.1335–

529 1341, 2012.

530 Humphrey, B. D., Klasing, K.C., 2003. Modulation of nutrient metabolism and homeostasis  
531 by the immune system. In: Proceedings of the European Symposium on Poultry Nutrition,  
532 Lillehammer, 577 Norway.

533 Jiang, Q. 2014. Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-  
534 inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Rad.*  
535 *Bio and Med.* 72:76-90.

536 Jiang, Q.; P. W. WaldrouP; C. A. Fritts. 2005. Improving the utilization of diets low in  
537 crude protein for broiler chicken 1. Evaluation of special amino acid  
538 supplementation to diets low in crude protein. *Int. Journ. Poul. Sci.* v.4, p.115–  
539 122.

540 Karavolias J, Salois MJ, Baker KT and Watkins K. 2018. Raised without antibiotics:  
541 impact on animal welfare and implications for food policy. *Transl Anim Sci.* 2:337  
542 – 48.

543 KIM, Y. S; HO, S. B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent  
544 insights and progress. *Current Gastroenterology Reports*, v.12, p.319-330, 2010.

545 Kurt-Jones, E. A., L. Cao, F. Sandor, A. B. Rogers, M. T. Whary, P. R. Nambiar, A.  
546 Cerny, G. Bowen, J. Yan, S. Takaishi, A. L. Chi, G. Reed, J. Houghton, J. G. Fox,  
547 and T. C. Wang. 2007. Trefoil family factor 2 is expressed in murine gastric and  
548 immune cells and controls both gastrointestinal inflammation and systemic  
549 immune responses. *Infect. Immun.* 75: 471–80.

550 Lehman, R., Moran, E.T., Hess, J.B. 2009 Response of coccidiostat-versus  
551 vaccination-protected broilers to gelatin inclusion in high and low crude  
552 protein diets. *Poult. Sci.* 88:984–993.

553 Lee, S.H., Lillehoj, H.S, Jang, I. S., Lee, K. W., Bravo, D. and Lillehoj, E.P. 2011.  
554 Effects of dietary supplementation with phytonutrients on vaccine-

555 stimulated immunity against infection with *Eimeria tenella*. *Veterinary*  
556 *Parasitology*.181:97–105.

557 Lillehoj, H.S. and Li, G. 2004. Nitric oxide production by macrophages  
558 stimulated with coccidian sporozoites, lipopolysaccharide, or interferon- $\gamma$ ,  
559 and its dynamic changes in SC and TK strains of chickens infected with  
560 *Eimeria tenella*. *Avian Diseases*, v.48, p.244–253.

561

562 Moran, E. T. Jr. 2008. Feeding the villi. *World's Poultry Science*. 64:150

563 Niewold, T.A. 2007. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial  
564 growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. *World Poult. Sci. Jour.*  
565 86: 605-609.

566 Pastorelli, H.; van Milgen, J.; Lovatto, P.; Montagne, L. 2012. Meta-analysis of feed intake  
567 and growth responses of growing pigs after a sanitary challenge. *Animal*. 6:952–961.

568 Perez-Carbajal, C., D. Caldwell, M. Farnell, K. Stringfellow, S. Pohl, G. Casco, A. Pro-  
569 Martinez, and C. A. Ruiz-Feria. 2010. Immune response of broiler chickens fed  
570 different levels of arginine and vitamin E to a coccidiosis vaccine and *Eimeria*  
571 challenge. *Poult. Sci.* 89:1870–1877.

572 Shirley, M.W and H. S. Lillehoj. 2012. The long view: a selective review of 40 years  
573 of coccidiosis research. *Avian Pathology* 41:111–121.

574 Miller, H. R. P. and Y. Narva. 1979. *Nippostrongylus brasiliensis*-intestinal goblet cell  
575 response in adoptively immunized rats. *Exper. Paras.* 47:81–90.

576 Silva, T. F., and Penna, A. L. B. (2012) Chemical characteristics and functional  
577 properties of collagen. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 71:3.

578 Silva, I. C. M., A. M. L. Ribeiro, C. W. Canal, C. C. Pinheiro, M. M. de Vieira, T. A.  
579 Gonçalves, R. A. Pereira, and L. Lacerda. 2009. Broiler chicken responses to

580 immunological stimuli as mediated by different levels of vitamin E in the diet. J.  
 581 Appl. Poult. Res. 18:752-760.

582 Suzuki, S., M. Hayama, M. Nakamura, K. Yamauchi, F. Maruta, S. Miyagawa, and H.  
 583 Ota. 2006. Trefoil factor 2 in gland mucous cell mucin in the mucous gel covering  
 584 normal or damaged gastric mucosa using the mongolian gerbil model. Scand. J.  
 585 Gastroenterol. 41:1390–1397.

586 Silva, I. C. M., Ribeiro, A. M.L., Canal, C.W., Vieira, M.M., Pinheiro, C.C.,  
 587 Gonçalves, T., de Moraes, M.L., Ledur, V.S. (2011) Effect of Vitamin E Levels  
 588 on the Cell-Mediated Immunity of Broilers Vaccinated Against Coccidiosis. *Braz.*  
 589 *Jour. of Poult. Sci.*13:53-56.

590 Tappel, A. L. 1972. Vitamin E and free radical peroxidation of lipids. Ann. N.Y. Acad.  
 591 Sci. 203:12–28.

592 Williams, R.B., 2005. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens:  
 593 rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian*  
 594 *Pathology* 3: 159–180.

595

**Table 1.** Experimental treatments

<b>Treatment</b>	<b>Dietary Treatments</b>	<b>Protection</b>
T1	Salinomycin	Cocciostat
T2	Salinomycin + Vitamin E <sup>2</sup>	Cocciostat
T3	Salinomycin + Gelatin <sup>1</sup>	Cocciostat
T4	Salinomycin + Vitamin E + Gelatin <sup>1</sup>	Cocciostat
T5	Vaccine	Vaccination
T6	Vaccine + Vitamin E <sup>2</sup>	Vaccination
T7	Vaccine + Gelatin <sup>1</sup>	Vaccination
T8	Vaccine + Vitamin E + Gelatin	Vaccination

<sup>1</sup> 2% inclusion of gelatin is expressed on a total mixed diet basis

<sup>2</sup> 70mg/kg of Vitamin E is expressed on kg of feed

597 **Table 2.** Experimental diets with and without Gelatin and Vitamin E

%, ingredient	Pre-Starter (1 -7 d )		Initial (8 -21 d )		Grower (22 - 35 d )		Finisher (36 - 42 d )	
	control	w/ gelatin	control	w/ gelatin	control	w/ gelatin	control	w/ gelatin
Corn	56.64	56.71	58.91	60.7	61.21	62.99	65.66	67.42
Soybean meal	37.76	35.54	34.84	30.54	31.85	27.55	27.77	23.51
Soybean oil	1.38	1.42	2.67	2.67	3.45	3.8	3.42	3.77
L-Lysine HCl	0.3	0.3	0.38	0.38	0.24	0.29	0.27	0.32
DL-Methionine	0.36	0.36	0.35	0.35	0.28	0.33	0.27	0.31
L-Threonine	0.11	0.11	0.1	0.1	0.06	0.09	0.06	0.09
NaCl	0.52	0.52	0.5	0.5	0.47	0.47	0.46	0.46
Bicalcium Phosphate	1.89	1.9	1.59	1.59	1.32	1.36	1.11	1.15
Limestone	0.91	0.91	0.94	0.94	0.88	0.88	0.8	0.79
Choline	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Gelatin <sup>1</sup>	0	2.0	0	2.0	0	2.0	0	2.0
Constant <sup>2</sup>	.....to 100%.....							
	calculated composition							
ME, kcal/kg	2960		3050		3150		3200	
CP, %	22.4		21.21		19.9		18.4	
	Amino Acids							
Dig Lys, %	1.324	1.324	1.275	1.275	1.131	1.131	1.067	1.067
Dig Met, %	0.651	0.655	0.588	0.627	0.552	0.592	0.525	0.525
Dig Met+Cis, %	0.953	0.953	0.876	0.876	0.826	0.826	0.774	0.774
Dig Thr, %	0.861	0.861	0.791	0.791	0.735	0.735	0.689	0.689
Dig Trp, %	0.257	0.254	0.241	0.217	0.225	0.2	0.211	0.211
Dig Arg, %	1393	1394	1308	1317	1221	1.23	1145	1148
Dig Val, %	0.927	0.923	0.876	0.837	0.824	0.785	0.763	0.754
Dig Iso, %	0.865	0.86	0.814	0.763	0.762	0.711	0.711	0.6453
Dig Leu, %	1.723	1.716	1.651	1.584	1.576	1.509	1.424	1.357
Dig His, %	0.536	0.532	0.509	0.466	0.482	0.439	0.442	0.399
	Noessential Amino Acids							
Dig Gli, %	0.910	1.360	0.860	1.276	0.810	1.226	0.736	1.162
Dig Pro, %	1.306	1.543	1.258	1.462	0.974	1.412	1.152	1.356
Dig Ser, %	1.136	1.152	1.075	1.047	1.012	0.985	0.931	0.905

598

599 <sup>1</sup>Pure beef gelatin, Gelnex Company, Road 283, km 36. Ita, SC –Brazil 89760-000.

600 <sup>2</sup>Constant included 0.034% and 0.100% each vitamin & mineral premixes (provided the following per kg of  
601 premix: Vitamin premix = 34,520,000 IU vitamin A, 7,200,000 IU vitamin D3, 8,600 mg vitamin K, 6,700  
602 mg vitamin B1, 20,000 mg vitamin B2, 9,000 mg vitamin B6, 72,000 mcg vitamin B12, 34,000 mg pantothenic  
603 acid, 140,000 mg niacin, 2,800 mg folic acid, and 240 mg biotin. Mineral premix = cobalt 200 mg, 88,000  
604 mg manganese, 95,535 mg zinc, 64,715 mg iron, 15,000 mg copper, 1,795 mg iodine, 200 mg selenium). 70  
605 mg/kg Vitamin E was add *on top* according to treatments. Coccidiostat Group feed with 0.05% Salinomycin  
606 (Bio-Cox 60 Granular, Alpharma Inc). Kaolin was add according to treatments and considered to have zero  
607 nutrient contribution. Vaccinated Group feed without coccidiostat - birds vaccinated.

608

609

610

611

612

613

614

615 **Table 3.** Oligonucleotide primers used for quantitative reverse transcription-PCR of  
616 chicken cytokines  
617

Type	Gene	Primer Sequence <sup>1</sup>	Genbank accession no. <sup>3</sup>
Reference	GADPH* <sup>2</sup>	F:GGTGGTGCTAAGCGTGTTAT R:ACCTCTGTCATCTCTCCAC	KO1458
		F:TGGGCATCAAGGGCTACA R:TCGGGTTGGTTGGTGATG	AF111631
Pro inflammatory	IL-1B	F:CAAGGTGACGGAGGAGGAC R:TGGCGAGGAGGGATTCT	AJ309540
	IL-6	F:CTCCGATCCCTTATTCTCCTC R:AAGCGGTTGTGGTCTCAT	AJ493595
	IL-17	F:CCTGAGTATTCCAGCAACGCA R:ATCCACCAGCTTGATGCTACTAAC	AB194710
	TNFSF15	F:AGCTGACGGTGGACCTATTATT R:GGCTTTGCGCTGGATTC	Y07922
	IFN- $\gamma$	F:TCTGGGACCACTGTATGCTCT R:ACACCAGTGGGAAACAGTATCA	AF000631
Th1	IL-2	F:AGACTCCAATGGGCAAATGA R:CTCTTCGGCAAATGGACAGT	NM_213571
	IL-4	F:AACATGCGTCAGCTCCTGAAT R:TCTGCTAGGAACTTCTCCATTGAA	FJ907790.1
Th2	IL10	F:CGGGAGCTGAGGGTGAA R:GTGAAGAAGCGGTGACAGC	AJ621614
	IL13	F:CCAGGGCATCCAGAAGC R:CAGTGCCGGCAAGAAGTT	AJ321735
Chemokine	IL8	F:GGCTTGCTAGGGGAAATGA R:AGCTGACTCTGACTAGGAAACTGT	AJ009800
	MUC2	F:ATGCGATGTTAACACAGGACTC R:GTGGAGCACAGCAGACTTTG	JX284122.1
Mucins	Muc5ac	F:TGTGGTTGCTATGAGAATGGA R:TTGCCATGGTTTGTGCAT	XM_025151100.1
	Muc13	F:GCATTCTCAAGCAGAGGTG R:CTCAGGCTGCCGTGATATTT	XM_025152568.1
Trefoil factor 2	TFF2	F:GCTGTAGCCCTCATCAGCTC R:CTGGCAGCTATTTTGCCTG	XM_010724393.2
CD36 molecule	CD36	F:GAATTGCTGTGGAAGTGCTG R:TGGTCCCAACAGACTCACTG	XM_025147445.1
Inducible nitric oxide synthase	iNOS	F:TGGGTGGAAGCCGAAATA R:GTACCAGCCGTTGAAAGGAC	XM_034069034.1

618 <sup>1</sup>F: forward; R reverse;  
619 <sup>2</sup>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  
620 <sup>3</sup> ID: GenBank access number  
621 \*Housekeeping gene



**Table 4.** Performance of broilers vaccinated or not for coccidiosis receiving supplementation with gelatine (Gel) and vitamin E (Vit E)

<b>Treatments</b>	<b>BW 21</b>	<b>BWG 1-21</b>	<b>FI 1-21</b>	<b>FCR 1-21</b>	<b>BW 42</b>	<b>BWG 1-42</b>	<b>FI 1-42</b>	<b>FCR 1-42</b>
Coccidiostat	971	923	1265	1.37	3213	3165	5010	1.58
Coccidiostat + Vitamin E	1048	1000	1317	1.32	3240	3163	5028	1.60
Coccidiostat + Gelatin	1102	1053	1308	1.24	3293	3250	5125	1.57
Coccidiostat + Vitamin E + Gelatin	1096	1048	1322	1.26	3357	3318	5108	1.53
Vaccine	914	866	1206	1.39	3090	3042	4995	1.64
Vaccine + Vitamin E	891	842	1216	1.44	3060	3011	4960	1.64
Vaccine + Gelatin	891	843	1169	1.39	3162	3104	4959	1.59
Vaccine + Vitamin E + Gelatin	959	910	1208	1.32	3204	3152	5011	1.59
<b>Contrasts</b>	<b>P Value<sup>1</sup></b>							
Coccidiostat <i>vs.</i> Vaccine	0.046	0.032	Ns	ns	0.031	ns	Ns	ns
Coccidiostat <i>vs.</i> Coccidiostat + Vitamin E	0.008	0.011	Ns	ns	ns	ns	Ns	ns
Coccidiostat <i>vs.</i> Coccidiostat + Gelatin	<.0001	<.0001	Ns	<0.001	ns	ns	Ns	ns
Coccidiostat <i>vs.</i> Coccidiostat + Vitamin E + Gelatin	<.0001	<.0001	ns	0.003	0.012	0.012	Ns	0.001
Vaccine <i>vs.</i> Vaccine + Vitamin E	ns	Ns	Ns	ns	ns	ns	Ns	ns
Vaccine <i>vs.</i> Vaccine + Gelatin	ns	Ns	Ns	ns	ns	ns	Ns	ns
Vaccine <i>vs.</i> Vaccine + Vitamin E + Gelatin	ns	Ns	Ns	0.070	0.046	ns	Ns	ns
<b>SE<sup>2</sup></b>								
	15.5	15.6	16.0	0.01	26.3	32.9	52.6	0.01

<sup>1</sup>Probabilities lower than 0.05 are considered.

<sup>2</sup>Standard Error

ns = no significance

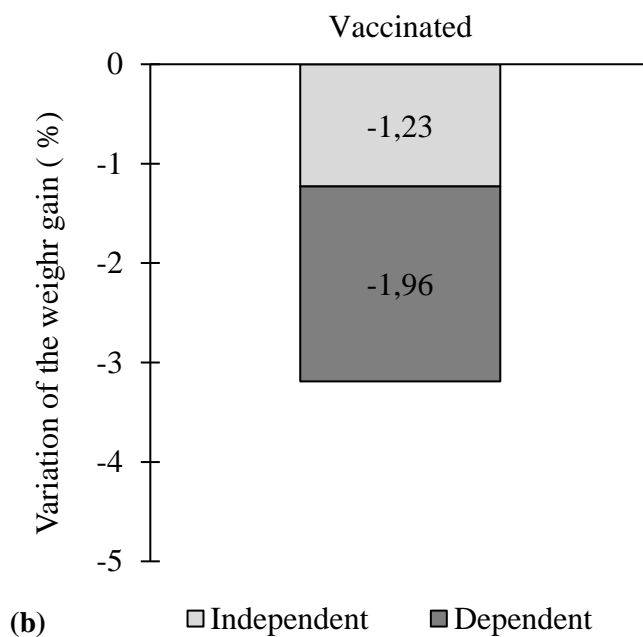
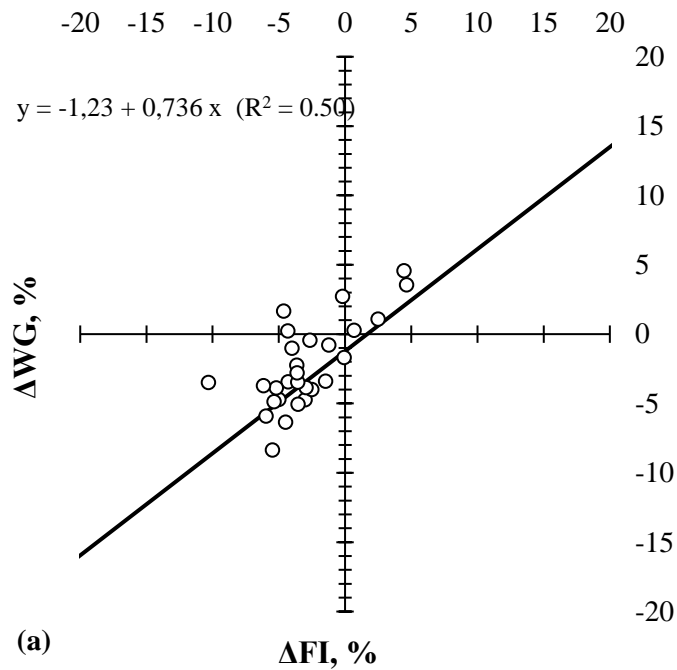
**Table 5.** Performance of broilers vaccinated or not for coccidiosis receiving supplementation with gelatine (Gel) and vitamin E (Vit E) of 22 to 42 days

<b>Treatments</b>	<b>BW 42</b>	<b>BWG 22-42</b>	<b>FI 22-42</b>	<b>FCR 22-42</b>
Coccidiostat	3213	2240	3406	1.52
Coccidiostat + Vitamin E	3240	2192	3381	1.54
Coccidiostat + Gelatin	3293	2191	3392	1.54
Coccidiostat + Vitamin E + Gelatin	3357	2270	3431	1.51
Vaccine	3090	2224	3377	1.52
Vaccine + Vitamin E	3060	2168	3280	1.51
Vaccine + Gelatin	3162	2260	3329	1.47
Vaccine + Vitamin E + Gelatin	3204	2243	3347	1.49
<b>Contrasts</b>	<b>P Value<sup>1</sup></b>			
Coccidiostat <i>vs.</i> Vaccine	0.031	ns	ns	ns
Coccidiostat <i>vs.</i> Coccidiostat + Vitamin E	Ns	0.077	ns	ns
Coccidiostat <i>vs.</i> Coccidiostat + Gelatin	Ns	ns	ns	ns
Coccidiostat <i>vs.</i> Coccidiostat + Vitamin E + Gelatin	0.012	ns	ns	ns
Vaccine <i>vs.</i> Vaccine + Vitamin E	Ns	ns	ns	ns
Vaccine <i>vs.</i> Vaccine + Gelatin	Ns	0.019	ns	0.010
Vaccine <i>vs.</i> Vaccine + Vitamin E + Gelatin	0.046	0.083	ns	ns
	<b>SE<sup>2</sup></b>			
	18.3	10.5	15.7	0.007

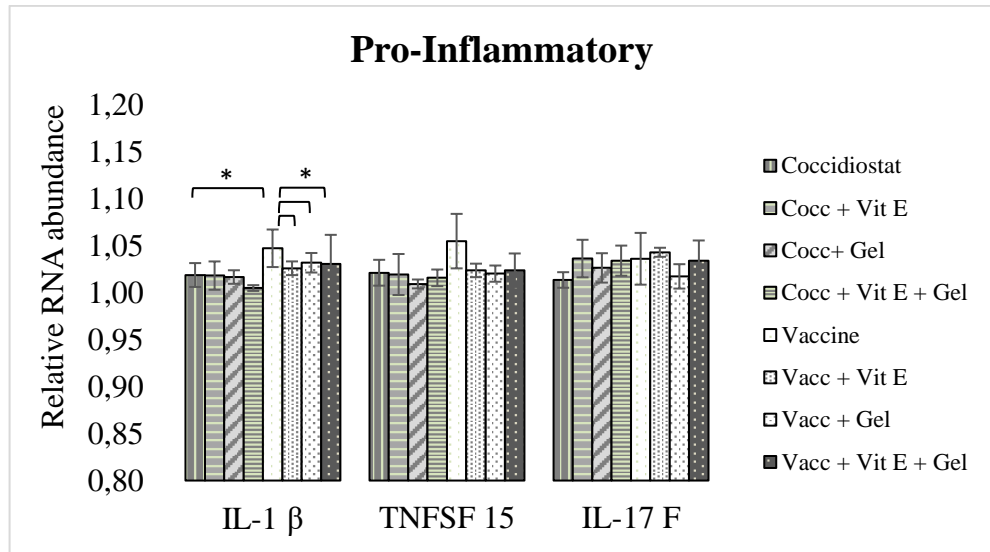
<sup>1</sup>Probabilities lower than 0.05 are considered.

<sup>2</sup>Standard Error

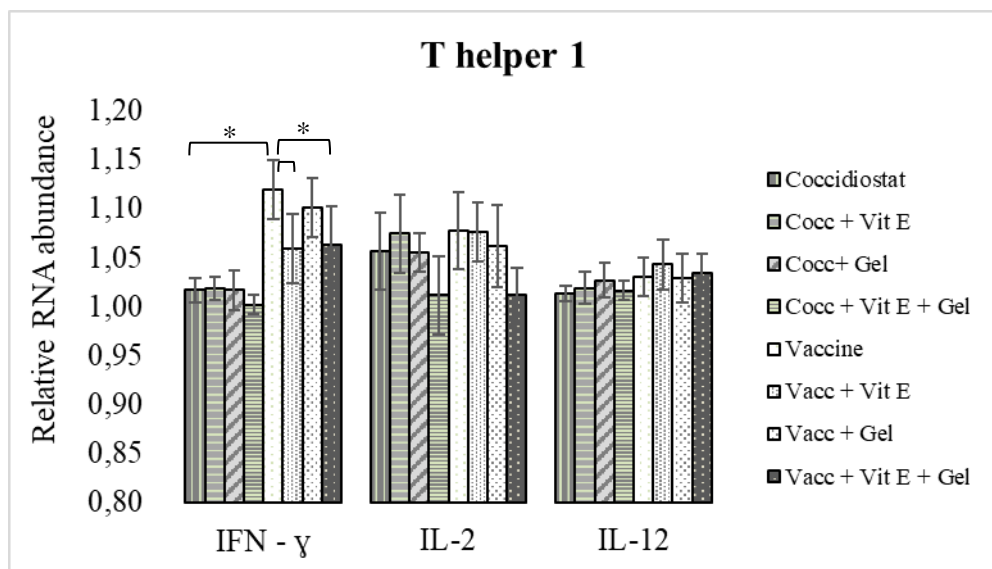
ns = no significance



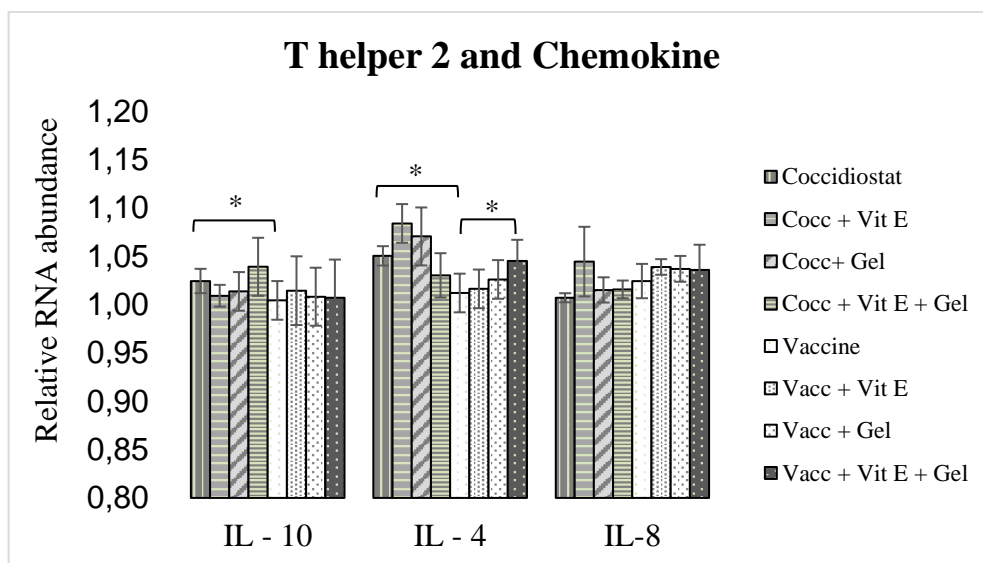
**Figure 1.** Relationship between the reductions in feed intake and growth rate (based on Pastorelli et al. 2012): (a) Relationship between the change in growth ( $\Delta$ WG, Weight Gain 1 to 42 days) and feed intake ( $\Delta$ FI, Feed Intake 1 to 42 days) of chickens vaccinated for coccidiosis. Responses are expressed as results of the chickens protect by coccidiostats relative to that of vaccinated chickens on each group. The lines represent the linear model adjustments. (b) Partitioning of the reduction in the average growth rate resulted from vaccination between the fraction due to change in maintenance requirement (■ not associated with a reduction in feed intake) or due to the change in feed efficiency (□ associated with a reduction in feed intake).



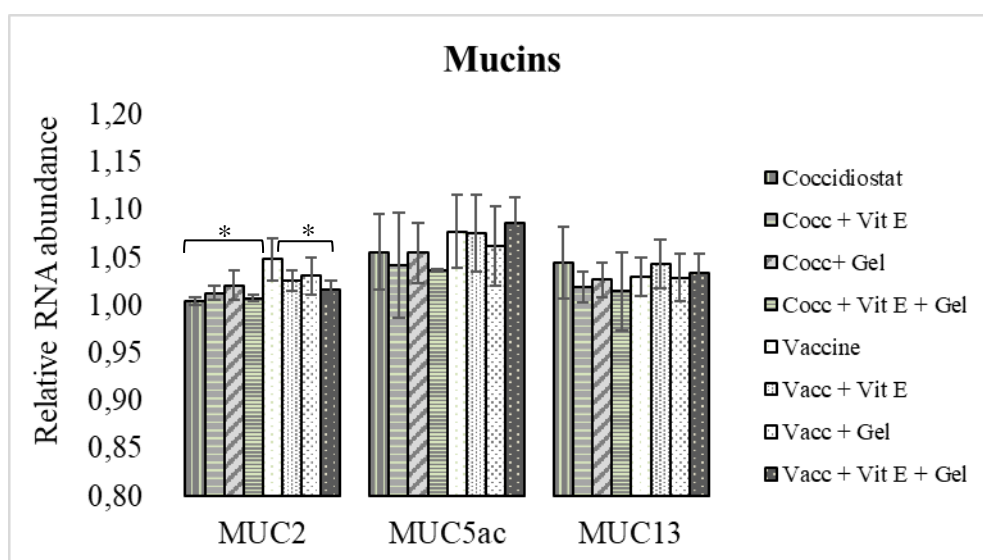
**Figure 2.** Effect of coccidiosis vaccination or in-feed salinomycin on pro-inflammatory intestinal cytokine transcript levels. At 28 days post-hatch, intestinal tissues were removed and the levels of transcript for IL1 $\beta$ , TNFSF15, IL-17F, and GAPDH were quantified by real time RT-PCR. The mRNA levels for each cytokine were normalized to the GAPDH internal control. Vertical bars represent mean  $\pm$  SD normalized mRNA levels (n = 7 repetition/treatment). Contrast Bars are significantly different (P < 0.05).



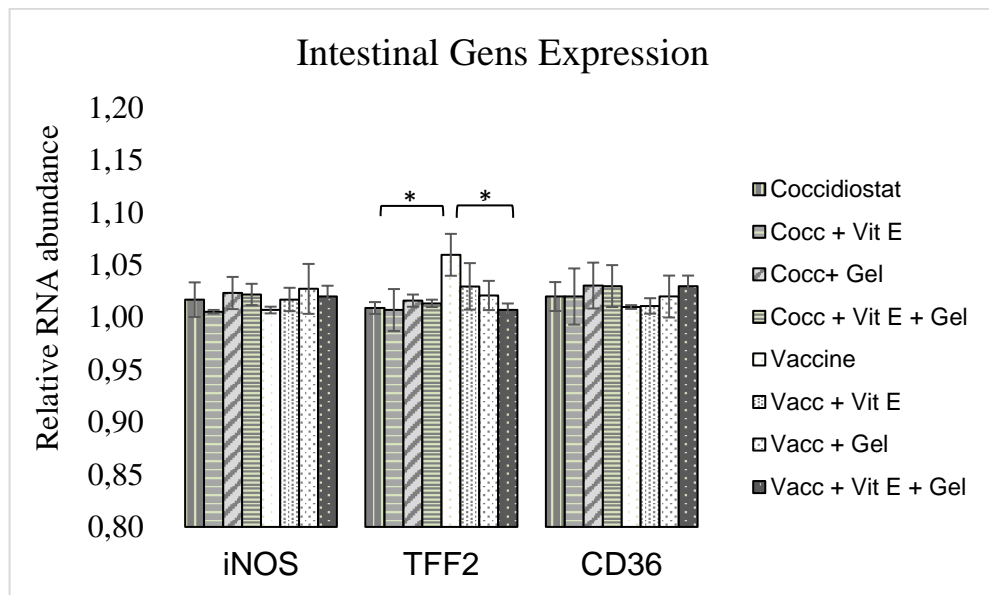
**Figure 3.** Effect of coccidiosis vaccination or in-feed salinomycin on T helper 1 intestinal cytokine transcript levels. At 28 days post-hatch, intestinal tissues were removed and the levels of transcript for IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, and GAPDH were quantified by real time RT-PCR. The mRNA levels for each cytokine were normalized to the GAPDH internal control. Vertical bars represent mean  $\pm$  SD normalized mRNA levels (n = 54). Contrast Bars are significantly different (P < 0.05).



**Figure 4.** Effect of coccidiosis vaccination or in-feed salinomycin on T helper 2 intestinal cytokine transcript levels.. At 28 days post-hatch, intestinal tissues were removed and the levels of transcript for IL-10, IL-4, IL-8, and GAPDH were quantified by real time RT-PCR. The mRNA levels for each cytokine were normalized to the GAPDH internal control. Vertical bars represent mean  $\pm$  SD normalized mRNA levels (n = 7). Contrast Bars are significantly different (P < 0.05).



**Figure 5.** Effect of coccidiosis vaccination or in-feed salinomycin on intestinal mucins transcript levels. At 28 days post-hatch, intestinal tissues were removed and the levels of transcript for MUC2, MUC5ac, MUC13, and GAPDH were quantified by real time RT-PCR. The mRNA levels for each prime were normalized to the GAPDH internal control. Vertical bars represent mean  $\pm$  SD normalized mRNA levels (n = 7). Contrast Bars are significantly different (P < 0.05).



**Figure 6.** Effect of coccidiosis vaccination or in-feed salinomycin on intestinal gens transcript levels. At 28 days post-hatch, intestinal tissues were removed and the levels of transcript for iNOS, TFF, CD36, and GAPDH were quantified by real time RT-PCR. The mRNA levels for each prime were normalized to the GAPDH internal control. Vertical bars represent mean  $\pm$  SD normalized mRNA levels (n = 7). Contrast Bars are significantly different ( $P < 0.05$ ).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho mostrou que a inflamação causada pela vacinação leva à diminuição do desempenho e também pode agir mudando a composição da microbiota. Principalmente com a possibilidade da proibição dos antibióticos promotores de crescimento, é preciso ampliar o conhecimento e as estratégias nutricionais para usar essa ferramenta como controle da coccidiose intestinal.

A vacinação para coccidiose influenciou negativamente o desempenho vivo de frangos de corte em comparação ao controle por coccidiostáticos. Os antibióticos ionóforos podem permitir o crescimento das aves por meio da inibição da produção e excreção de citocinas pelas células imunes e beneficiar a microbiota comensal. Os antibióticos também podem simplesmente diminuir a carga microbiana total, levando a menos inflamação e menor custo energético para o animal.

O suprimento de aminoácidos como a glicina e prolina, o efeito antioxidante e imunomodulador da vitamina E parecem permitir que as aves se recuperem melhor dos efeitos da vacina nas últimas 2 semanas, porém são insuficientes para que as aves tenham o mesmo desempenho do que quando são tratadas com um antibiótico ionóforo. O aumento dos níveis de aminoácidos e o uso de um antioxidante não esteroide com funções antiinflamatórias, como a vitamina E, podem minimizar o desempenho inferior das aves vacinadas em relação ao grupo que não recebeu o aporte nutricional.

A realização desta pesquisa, entre outras realizadas que não foram incluídas nesse material, como o desenvolvimento de duas meta-análises; a primeira avaliando as respostas de desempenho de frangos desafiados por *Eimeria spp.* e a segunda avaliando o uso da molécula de ractopamina em suínos em terminação: meta-análise e avaliação do ciclo de vida, proporcionou experiência e conhecimento. Também foi conduzido um experimento avaliando níveis proteicos e adição de protease sobre a microbiota das aves que somou a minha trajetória acadêmica. Esses quatro anos possibilitaram trabalho com áreas distintas da produção animal,

em diferentes laboratórios, contribuindo para um aprendizado interdisciplinar em áreas como biologia molecular e sequenciamento genético de última geração e uma visão sistêmica do objeto de pesquisa. Este trabalho deixa além de um aprendizado científico e técnico, questionamentos que podem continuar a serem explorados.



## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 9th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2017.
- ABUMRAD, N. A. *et al.* Cloning of rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 268, n. 24, p. 17665–17668, 1993.
- ADEDOKUN, S. A. *et al.* Ileal endogenous amino acid losses: response of broiler chickens to fiber and mild coccidial vaccine challenge. **Poultry Science**, Champaign, v. 91, p. 899–907, 2012.
- BABU, U. S. *et al.* Differential reactive oxygen and nitrogen production and clearance of *Salmonella* servers by chicken and mouse macrophage. **Developmental and Comparative Immunology**, Tarrytown, v. 30, p. 942–953, 2006.
- BERCHIERI JUNIOR, A. *et al.* **Doença das aves**. 2. ed. São Paulo: FACTA, 2009.
- BOA-AMPONSEM, K. *et al.* Vitamin E and imune responses of broiler pureline chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, n. 4, p. 466-470, 2000.
- BOLELI, I. C.; MORITA, V. S. Mucosa gastrintestinal: crescimento, renovação, reparo e defesa. *In*: MACARI, M.; MAIORKA, A. **Fisiologia das aves comerciais**. São Paulo: FUNEP, 2017. p. 206-216.
- BOOMGAARDT, J.; BAKER, D. D. H. Sequence of limiting amino acids in gelatin for the growing chick. **Poultry Science**, Champaign, v. 51, p. 1650- 1655, 1972.
- CAMPBELL, T. W. Hematology of birds. *In*: THRALL, M. A. **Veterinary hematology and clinical hemistry**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. cap. 17, p. 225-257.
- CASTRO, G. A. *et al.* Anti-ulcerogenic effect of a whey protein isolate and collagen hydrolysates against ethanol ulcerative lesions on oral administration to rats. **Journal of Medicinal Food**, New York, v. 13, n. 1, p. 83-90, 2010.
- CHACANA, P. A. *et al.* Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. **Revista de Medicina Veterinária**, [Montevideo], v. 85, n. 5, p. 179-189, 2004.
- CHAPMAN, H. D. *et al.* Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 617–629, 2002.
- CHEN, M. Y. *et al.* Gut expression and regulation of FAT/CD36: possible role in fatty

acid transport in rat enterocytes. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 281, n. 5, p. 916–923, 2001.

COLLIER, C. T. *et al.* Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 122, n. 1/2, p. 104-115, 2008.

CORZO, A. *et al.* Dietary glycine needs of broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, p. 1382–1384, 2004.

CURRENT, W. L.; UPTON, S. J.; LONG, P. L. Taxonomy and life cycles. *In*: LONG, P. L. (ed.). **Coccidiosis of man and domestic animals**. Boca Raton: CRC, 1990. p. 1-17.

DEAN, D. W.; BIDNER, T. D.; SOUTHERN, L. L. Glycine supplementation to low crude protein, amino acid-supplemented diets supports optimal performance of broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 85, p. 288–296, 2006.

DUNSTAN, J. A. *et al.* Associations between antioxidant status, markers of oxidative stress and immune responses in allergic adults. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 36, n. 8, p. 993-1000, 2006.

ENGBERG, R. M. *et al.* Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, p. 1311–1319, 2000.

ERF, G. F. Cell-mediated immunity in poultry. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, n. 4, p. 580-590, 2008.

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

FAIRBROTHER, A.; SMITS, J.; GRASMAN, K. A. Avian immunotoxicology. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Nairobi, v. 7, p. 105-137, 2004.

FELLAH, J. S.; JAFFREDO, T.; DUNON, D. Development of avian immune system. *In*: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K. A. **Avian immunology**. Amsterdam: Elsevier, 2008. cap. 4, p. 5-67.

FERNANDES, J. I. M. *et al.* Suplementação dietética de levedura de cerveja e de minerais orgânicos sobre o desempenho e resposta imune em frangos de corte desafiados com a vacina de coccidiose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 4, n. 8, p. 1496-1502, 2013.

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

FIALKOW, L.; WANG, Y.; DOWNEY, G. P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free Radical Biology and**

**Medicine**, New York, v. 42, p. 153-164, 2007.

FRIEDMAN, A.; BARTOV, I.; SKLAN, D. Humoral immune response impairment following excess vitamin E nutrition in the chick and turkey. **Poultry Science**, Champaign, v. 77, p. 956-962, 1998.

FORDER, R. E. A. *et al.* Quantitative analyses of genes associated with mucin synthesis of broiler chickens with induced necrotic enteritis. **Poultry Science**, Champaign, v. 91, p. 1335–1341, 2012.

HAMON, M, A.; QUINTIN, J. Innate immune memory in mammals. **Seminars in Immunology**, London, v. 28, n. 4, p. 351–358, 2016.

HAUG, J. I.; DRAGET, I. K.; SMIDROD, O. Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 203-213, 2004.

HARMON, B. G. Avian heterophils in inflammation and disease resistance. **Poultry Science**, Champaign, v. 77, p. 972-977, 1998.

JEURISSEN, S. H. M.; JANSE, E. M. Germinal centers develop at predilected sites in the chickens spleen. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 27, n. 41, p. 237-355, 1994.

JIANG, Q. Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 72, p. 76-90, 2014.

JIANG, Q.; WALDROUP, P. W.; FRITTS, C. A. Improving the utilization of diets low in crude protein for broiler chicken. Evaluation of special amino acid supplementation to diets low in crude protein. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v. 4, p. 115–122, 2005.

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

JOLLY, C. A. Dietary restriction and immune function. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 134, p. 1853–1856, 2004.

JUUL-MADSEN, H. R. *et al.* Ontogeny and characterization of blood leukocyte subsets and serum proteins in piglets before and after weaning. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 133, n. 2/4, p. 95-108, 2008.

KENNETH, M. *et al.* **Imunobiologia de janeway**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

KJELLEV, S. The trefoil factor family – small peptides with multiple functionalities. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 66, n. 6, p. 1350-1369, 2009.

KIM, Y. S.; HO, S. B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent

insights and progress. **Current Gastroenterology Reports**, Philadelphia, v. 12, n. 5, p. 319-330, 2010.

KIM, D. K. *et al.* Differential immune-related gene expression in two genetically disparate chicken lines during infection by *Eimeria maxima*. **Developmental Biology**, San Diego, v. 132, p. 131–140, 2008.

KIM, J. J.; KHAN, W. I. Goblet cells and mucins: role in innate defense in enteric infections. **Pathogens**, Basel, v. 2, n. 1, p. 55-77, 2013.

KITESSA, S. M. *et al.* Mucin gene mRNA levels in broilers challenged with *Eimeria* and/or *Clostridium perfringens*. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 58, n. 3, p. 408-414, 2014.

KLASING, K. C. Influence of acute feed deprivation or excess feed intake on immunocompetence of broiler chicks. **Poultry Science**, Champaign, v. 67, p. 626–634, 1988.

KURT-JONES, E. A. Trefoil family factor 2 is expressed in murine gastric and immune cells and controls both gastrointestinal inflammation and systemic immune responses. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 75, n. 1, p. 471–80, 2007.

KEESTRA, A. M. *et al.* Unique features of chicken Toll-like receptors. **Developmental and Comparative Immunology**, Tarrytown, v. 41, p. 316-323, 2013.

KONJUFGA, V. K. *et al.* Influence of dietary Vitamin E on fagocitic functions of macrophages in broilers. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, p. 1530-1534, 2004.

KUMAR, V. *et al.* The natural feed additive caprylic acid decreases *Campylobacter jejuni* colonization in market-aged broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 88, p. 61-64, 2009.

LEE, J. T. *et al.* Evaluation of Coccivac®-B 468 or salinomycin for control of field strain *Eimeria* challenge in broilers on two different feeding programs. **Journal of Applied Poultry**, [S.I.], v. 18, p. 458-464, 2009.

LEE, S. H. *et al.* Effects of dietary supplementation with phytonutrients on vaccine-stimulated immunity against infection with *Eimeria tenella*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 181, p. 97–105, 2011b.

LEE, J. T. The effect of dietary protein level on performance characteristics of coccidiosis vaccinated and nonvaccinated broilers following mixed-species *Eimeria* challenge. **Poultry Science**, Champaign, v. 90, p. 1916-1925, 2011a.

LEE, K. W. Comparison of live *Eimeria* vaccination with in-feed salinomycin on growth and immune status in broiler chickens. **Research in Veterinary Science**, London, v. 95, p. 110–114, 2013.

LEHMAN, R.; MORAN, E. T.; HESS, J. B. Response of coccidiostat-versus

vaccination-protected broilers to gelatin inclusion in high and low crude protein diets. **Poultry Science**, Champaign, v. 88, p. 984–993, 2009.

LESHCHINSKI, T. V.; CLASING, K. C. Relationship between the level of dietary vitamin E and immune response of broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 80, p. 1590-1599, 2001.

LI, G. *et al.* Immunopathology and cytokine responses in commercial broiler chickens with gangrenous dermatitis. **Avian Pathology**, London, v. 39, p. 255–264, 2010.

LI, G. Q. *et al.* Responses of chickens vaccinated with a live attenuated multi-valent ionophore-tolerant *Eimeria* vaccine. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 129, p. 179–186, 2005.

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

LILLEHOJ, H. S. Immunogenomic approaches to study host immunity to enteric pathogens. **Poultry Science**, Champaign, v. 86, p. 1491–1500, 2007.

LILLEHOJ, H. S.; MIN, W.; DALLOUL, R. A. Recent progress on the cytokine regulation of intestinal immune response to *Eimeria*. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, p. 611– 623, 2004.

LILLEHOJ, H. S.; LI, G. Nitric oxide production by macrophages stimulated with coccidian sporozoites, lipopolysaccharide, or interferon- $\gamma$ , and its dynamic changes in SC and TK strains of chickens infected with *Eimeria tenella*. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 48, p. 244–253, 2004.

LEVINE, P. P. A new coccidium pathogenic for chickens, *Eimeria brunetti* n. species (Protozoa: Eimeriidae). **The Cornell Veterinarian**, Ithaca, v. 32, p. 430–439, 1942.

LINDEN, S. K. *et al.* Mucins in the mucosal barrier to infection. **Mucosal Immunology**, New York, v. 1, n. 3, p. 183-197, 2008.

MACARI, M.; FURLAN, R. R.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2. ed. São Paulo: FUNEP, 2002.

MCBRIDE, B. W.; KELLY, J. M. Energy cost of absorption and metabolism in the ruminant gastrointestinal tract and liver: a review. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, p. 2997-3010, 1990.

MCDUGALD, L. R.; REID, W. M. Coccidiosis. *In*: CALNEK, B. W. (ed.). **Diseases of poultry**. Ames: Iowa State University Press, 1991. p. 780-797.

MCDEVITT, R. *et al.* Necrotic enteritis; a continuing challenge for the poultry industry. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 62, n. 2, p. 221-247, 2006.

MILLER, H. R. P.; NARVA, Y. *Nippostrongylus brasiliensis*-intestinal goblet cell

response in adoptively immunized rats. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 47, p. 81–90, 1979.

MILLER, H. R. P.; NARVA, Y.; PARISHM, C. R. Intestinal goblet cell differentiation in *Nippostrongylus*-infected rats after transfer of fractionated thoracic duck lymphocytes. **International Archives of Allergy and Immunology**, Basel, v. 59, n. 3, p. 281–285, 1979.

MORAN, E. T. Jr. Feeding the villi. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 64, p. 150, 2008.

MOSKOWITZ, R. W. Role of collagen hydrolysate on bone and joint disease. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, New York, v. 30, n. 2, p. 87-99, 2000.

NICKERSON, M. T. *et al.* Some physical properties of crosslinked gelatin-maltodextrin hydrogels. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 20, p. 1072-1079, 2006.

QURESHI, M. A.; HEGGEN, C. L.; HUSSAIN, I. Avian macrophage: effector functions in health and disease. **Developmental and Comparative Immunology**, Elmsford, v. 24, p. 103-119, 2000.

QURESHI, M. A.; HUSSAIN, I.; HEGGEN, C. L. Understanding immunology in disease and control. **Poultry Science**, Champaign, v. 77, p. 1126-1129, 1998.

RATCLIFFE, M. J. H. B cell development in gut associated lymphoid tissues. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 87, n. 3/4, p. 337-340, 2002.

SAKAMOTO, M. I. *et al.* Influence of glutamine and vitamin E on the performance and immune responses of broilers chickens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 8, n. 4, p. 243-249, 2006.

SANTIN, E.; MORAES, M. L.; SANCHES, A. W. D. Imunologia aplicada. *In*: MACARI, M.; MAIORKA, A. **Fisiologia das aves comerciais**. São Paulo: FUNEP, 2017. p. 466-485.

SCOTT, T. R. Our current understanding of humoral of poultry. **Poultry Science**, Champaign, v. 83, p. 574-579, 2004.

SHIRLEY, M. W.; SMITH, A. L.; TOMLEY, F. M. The biology of avian *Eimeria* with an emphasis on their control by vaccination. **Advances in Parasitology**, London, v. 60, p. 285-330, 2005.

SILVA, I. C. M. *et al.* Effect of vitamin e levels on the cell-mediated immunity of broilers vaccinated against coccidiosis. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 13, p. 53-56, 2011.

SILVA, T. F.; PENNA, A. L. B. Colágeno: características químicas e propriedades funcionais. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 71, n. 3, p. 530-539, 2012.

SONNENBURG, J. L. *et al.* Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. **Science**, Washington, DC, v. 307, p. 1955–1959, 2005.

SUZUKI, S. *et al.* Trefoil factor 2 in gland mucous cell mucin in the mucous gel covering normal or damaged gastric mucosa using the mongolian gerbil model. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, London, v. 41, n. 12, p. 1390–1397, 2006.

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

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

TYZZER, E. E. Coccidiosis in gallinaceous birds. **American Journal of Epidemiology**, Cary, v. 10, n. 2, p. 18–383, 1929.

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

WILLIAMS, R. B.; ANDREWS, S. J. The origins and biological significance of the coccidial lesions that occur in chickens vaccinated with a live attenuated anticoccidial vaccine. **Avian Pathology**, London, v. 30, p. 215– 220, 2001.

WILLIAMS, R. B.; GOBBI, L. Comparison of an attenuated anticoccidial vaccine and an anticoccidial drug programme in commercial broiler chickens in Italy. **Avian Pathology**, London, v. 31, p. 253-265, 2002.

WILLIAMS, R. B. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. **Avian Pathology**, London, v. 3, p. 159–180, 2005.

WINTERGERST, E. S.; MAGGINI, S.; HORNIG, D. H. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. **Annals of Nutrition Metabolism**, Basel, v. 51, n. 4, p. 301-323, 2007.

WOOF, J. M.; KERR, M. A. The function of immunoglobulin A in immunity. **The Journal of Pathology**, Lawrence, v. 208, n. 2, p. 270-82, 2006.

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





## APÊNDICES

### APÊNDICE A - Condições ambientais durante o período experimental

