

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIA RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Fabio Yuji Shibuya

**EFICÁCIA DA METILXANTINA NO CONTROLE DA EIMERIOSE EM
FRANGOS DE CORTE**

Santa Maria, RS

2023

Fabio Yuji Shibuya

**EFICÁCIA DA METILXANTINA NO CONTROLE DA EIMERIOSE EM
FRANGOS DE CORTE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), como requisito para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Dr. Helton Fernandes dos Santos

Santa Maria, RS
2023

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Shibuya, Fabio Yuji
EFICÁCIA DA METILXANTINA NO CONTROLE DA EIMERIOSE EM
FRANGOS DE CORTE / Fabio Yuji Shibuya.- 2023.
38 p.; 30 cm

Orientadora: Helton Fernandes dos Santos Sonia de
Avila Bottom
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2023

1. Eimeria Acervulina 2. Eimeria tenella 3.
Coccidiose 4. Metilxantina 5. Frangos de Corte I. Sonia
de Avila Bottom, Helton Fernandes dos Santos II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, FABIO YUJI SHIBUYA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

EFICÁCIA DA METILXANTINA NO CONTROLE DA EIMERIOSE EM FRANGOS DE CORTE

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), como requisito para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovado em: 10/02/2023

Helton Fernandes dos Santos, Dr., UFSM
(Presidente/Orientador)

Maristela Lovato, Dra., UFSM

Paulo Dilkin, Dr., UFSM

Santa Maria, RS
2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha nova família por ser a luz que ilumina meu caminho dia após dia. A minha esposa, Vanessa Cirinéa Tapia Barraza, por sempre acreditar na melhor versão de mim mesmo. Sou grato por tê-la conhecido e de fazer parte de sua vida. Te amar é o maior privilégio que a vida me deu.

Agradeço a minha família por ter me criado e educado a ser a pessoa que sou hoje. A meus pais, Alice Satsuki Komuro Shibuya e Marcelo Kenji Shibuya, e irmão, Rafael Yugo Shibuya, por me inspirarem a me esforçar ao máximo em tudo que faço. Por serem exemplos de transparência, honestidade e integridade. A minha madrinha, Magarida Komuro, minha tia Maria Helena Komuro, meus tios Hidemi Komuro, Kenji Komuro por sempre torcerem pelo melhor para mim. A meus tios Ossamu Shibuya, Hitomi Shibuya e Keiko Shibuya por sempre apostarem em mim. A meus primos Danilo Komuro, Jessica Komuro, Satie Komuro, Beatriz Komuro, Yuka Shibuya e Eri Shibuya pelo companheirismo eterno.

Aos nossos meninos canídeos: Jack e Spike, por aumentarem a vida e alegria em nosso lar.

Ao meu amigo e irmão de alma, João Cont Junior, por ter me acompanhado em toda minha jornada acadêmica, profissional e pessoal. Uma das pessoas que mais caiu, se reerguei e ri da situação ao meu lado muitas vezes.

Ao meu grande amigo Gustavo Kawamorita por ter crescido ao meu lado e me apoiado com sua amizade.

Aos meus colegas e mentores na avicultura: Everton Machado, Isabel Minoli, Claudemir Schmidt, Leonardo Demeda e Matheus Kerber por terem me ensinado com muita paciência e humildade sobre a vida nesse setor.

Ao meu antigo professor e orientador da Universidade de São Paulo, Ricardo Jose Garcia Pereira, por ter me cobrado e me ensinado a sempre tentar ser melhor.

Agradeço a minhas atuais colegas e amigas do Laboratório Central de Diagnóstico de Patologias Aviárias, Daiani Wissman, Gabriela Monteiro e Luiza de Freitas por terem me acolhido aqui na Universidade Federal de Santa Maria e me propiciado uma amizade calorosa.

Ao meu atual Orientador, professor Helton Fernandes dos Santos, por ter me aceito nessa nova jornada de braços abertos sempre disposto a me ensinar e orientar.

Ao programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio material e financeiro.

RESUMO

EFICÁCIA DA METILXANTINA NO CONTROLE DA EIMERIOSE EM FRANGOS DE CORTE

AUTOR: Fabio Yuji Shibuya

ORIENTADOR: Helton Fernandes dos Santos

A coccidiose é uma doença de alta incidência na avicultura comercial. É causada pelo protozoário *Eimeria sp.*, caracterizada por quadro entérico, lesão de mucosa intestinal dos frangos, diminuição do desenvolvimento, inclusive podendo causar a morte das aves, e o seu controle é ainda um desafio para a avicultura. Na procura por alternativas terapêuticas para a coccidiose, são utilizados produtos naturais como a metilxantina, um alcaloide com efeitos estimulantes encontrada no café, chá, cacau, guaraná e erva-mate. Dentre seus benefícios estão a capacidade de modular a imunidade inata e adaptativa, inclusive, estimulando a produção das citocinas, que são reativas a coccidiose. O objetivo deste estudo foi mensurar a eficácia da metilxantina no controle da coccidiose, em frangos de corte infectados por *Eimeria acervulina* e *Eimeria tenella*. Para tanto, realizou-se um estudo com 60 pintos de um dia de idade, mantidos por 28 dias, dispostos em 3 tratamentos: T1: controle negativo; T2: desafio via oral com *Eimeria acervulina* e *Eimeria tenella*; e T3: desafio via oral com *Eimeria acervulina* e *Eimeria tenella* e tratados com solução diluída (0,0105 g/L diluída em água a 30 ml/L) de metilxantina. Dados de ganho de peso foram coletados com 28 dias de idade, assim como abate e suas necropsias, onde foram separadas amostras de intestino e ceco para exame histopatológico. Os animais do T1 e T3, ao contrário do T2, apresentaram pesos estatisticamente similares para 95% de confiança ($\alpha = 0,05$) e não foram observadas lesões características de coccidiose e oocistos em suas alças intestinais e cecos. O T2 apresentou inflamação em sua mucosa, presença de protozoários compatíveis com *Eimeria acervulina* e perda significativa de performance no peso dos animais aos 28 dias. Desta forma, o tratamento com metilxantina se mostrou eficaz no controle dos sinais clínicos e lesões de *Eimeria acervulina* e *Eimeria tenella*.

Palavras-chave: *Eimeria acervulina*, *Eimeria tenella*, Coccidiose, Metilxantina, Frangos de corte.

ABSTRACT

EFFECT OF METHYLXANTHINE AGAINST COCCIDIOSIS IN BROILER

AUTHOR: Fabio Yuji Shibuya
ADVISOR: Helton Fernandes dos Santos

Coccidiosis is a common disease in poultry industry and the etiology is *Eimeria* sp. The disease is known for its enteric lesions, reduction of the intestinal epithelium reducing the poultry growing and increasing mortality. The poultry industry is demanding for alternative and natural products in order to treat and/or control avian diseases. Methylxanthine is an alkaloid with stimulant properties and extracted from coffee, tea, chocolate, cocoa tea, guarana or citrus sp. There are several benefits of its use such as the immunomodulatory potential in innate and adaptative immunity like stimulating the production of some cytokines in response to coccidiosis infection. The objective of this study was to evaluate the efficacy of Methylxanthine in the *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* control. Therefore, we compared 60 chicks separated in 3 treatments and maintained for 28 days. Group T (negative control); Group T2 (infected with *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella*); and Group T3 (infected with *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* and treated with Methylxanthine dilutes in water (30 ml/L). At 28 days of observation, performance data was obtained and the chicken were euthanized. At the necropsy, intestines and cecum samples were submitted to histopathological analysis. The Methylxanthine treatment reduced the performance losses and intestinal lesions from *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* as observed in the treated group (T3). The treatment with Methylxanthine proved efficacy in the infection control of coccidiosis in broiler.

Keywords: *Eimeria acervulina*, *Eimeria tenella*, Coccidiosis, Methylxanthine, Broiler.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 Coccidiose	10
2.1.1 Histórico	10
2.1.2 Etiologia	11
2.1.3 Epidemiologia	12
2.1.4 Patogenia	13
2.1.4 <i>Imunidade</i>	14
2.1.5 Sinais Clínicos	15
2.1.6 Lesões	16
2.1.7 Diagnóstico	18
2.1.8 Tratamento	18
2.1.9 Prevenção e Controle	19
2. 2 METILXANTINA	19
3. MANUSCRITO	22
F.Y. Shibuya ^{a,*} , M.I. Masaio ^d , G.D. Kommers ^c , V.C.T. Barraza ^c , L.I de Freitas ^a , P. Dilkin ^a , H.F. dos Santos ^a	23
Materials and methods	26
<i>Animais do estudo</i>	Erro! Indicador não definido.
<i>Desafio e Metilxantina</i>	Erro! Indicador não definido.
<i>Necrópsia e Histopatológico</i>	27
<i>Análise estatística</i>	27
Results and discussion	27
Conclusions	28
Conflict of interest statement	29
Acknowledgements	29
References	29
.....	31
4 CONCLUSÃO	33
5 REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

A coccidiose é uma doença entérica de grande importância na avicultura industrial. É causada por protozoários do gênero *Eimeria* pertencentes à classe *Sporozoa*. Além de afetar os intestinos, há relatos de outros órgãos acometidos como rins e fígado (ACHARYA, K.P. & ACHARYA, N., 2017; FRANSON et al., 1981). Estima-se que as perdas econômicas anuais por conta da doença chegam a aproximadamente 14,5 bilhões de dólares (BLAKE et al., 2020).

O quadro clínico da coccidiose se inicia após uma exposição do hospedeiro aos oocistos esporulados que se infectam por via oral, sendo facilitado quando os frangos são expostos a condições de estresse e/ou imunossupressão (CHANIE et al., 2009). Após sua entrada, o protozoário invade e se propaga nas células epiteliais intestinais. A doença pode causar a destruição da mucosa com consequente hemorragia e morte (NABIAN et al., 2018). Após o acometimento do lote de aves, são adotados protocolos medicamentosos para tentar conter o agravamento da enfermidade. Alguns exemplos dos principais produtos utilizados são sulfonamidas, nicarbazin, clopidol, quinolonas e amprólio (ADEWOLE, 2012; CHAPMAN et al., 2013).

A resposta imune à coccidiose é de natureza inata e adaptativa, sendo principalmente conduzida pelos linfócitos T CD4 que liberam diversas citocinas, dentre elas o interferon gama (IFN- γ). Outra citocina de importância são interleucina 10 (IL10) que tem ação anti-inflamatória regulando a resposta de outras citocinas que podem causar lesões na mucosa como interleucina 1B (IL-1B) e interleucina 6B (IL-6B) (CHAPMAN et al., 2013). A principal forma de prevenção da doença é pelo emprego de vacinação, podendo ser com vacinas vivas, atenuadas e até recombinantes. Observa-se no uso de vacinas, a maior expressão de citocinas (IFN- γ) e maior produção de anticorpos como imunoglobulina G (IgG) (TIAN et al., 2017). No entanto, o alto custo da fabricação das vacinas e o surgimento de cepas cada vez mais resistentes às drogas convencionais tem proporcionado maior demanda por alternativas no controle da coccidiose (CHAPMAN et al., 2013).

Os produtos naturais que geram menos resíduos e efeitos adversos nos animais de produção tem sido opções viáveis. Dentre eles são incluídos probióticos, acidificantes e extratos de plantas (fitoterápicos) para reduzir as lesões causados pela coccidiose (CHAPMAN et al., 2013; GADDE et al., 2017). Dentre os produtos naturais em destaque, pode-se citar a metilxantina. É um alcalóide purínico lipossolúvel encontrado em várias fontes vegetais como o guaraná, café, chá-preto, erva-mate, cacau e noz-de-cola e, há muito tempo importante na indústria alimentícia e farmacêutica (ASHIHARA & SUZUKI, 2004; ONATIBIA-ASTIBIA et

al., 2016; PAGLIARI et al., 2022). A metilxantina possui descrito diversos benefícios na imunidade, modulando a imunidade inata e adaptativa, sendo um potente agente para prevenção e tratamento de diversas doenças, desde quadros respiratórios, como asma, doença vascular periférica e cirrose, além de aumentar o potencial analgésico de fármacos como a aspirina (SAWYNOK et al., 2017). As metilxantinas apresentam também atividade antagonista aos receptores de Adenosina A1, A2a e A2b, providenciando um potencial analgésico quando administrado em doses de 35-100 mg/kg em roedores (SIEGERS, 1973). O objetivo do presente estudo foi de avaliar a eficácia da metilxantina (caféina) extraída da erva-mate para a manutenção da performance e controlar lesões de coccidiose em frangos de corte.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Serão abordados nesta revisão de literatura os protozoários do gênero *Eimeria* de interesse para a avicultura, bem como as características de importância clínica e epidemiológicas e aplicações da metilxantina.

2.1 Coccidiose

A coccidiose aviária é uma doença infecciosa de relevância econômica na avicultura industrial, uma vez que acomete as aves domésticas de produção. Esta infecção tem como agente etiológico as espécies do gênero *Eimeria* que ocasionam lesões e estrução de tecidos e células, especialmente do intestino, determinando diarreia sanguinolenta, aquosa a escura acompanhada pela má absorção de água e nutrientes, levando a perda de peso e até a morte (ALLEN & FETTERER, 2002). Estima-se que as perdas econômicas decorrentes da doença chegaram a aproximadamente a 1,5 bilhões de dólares em 1997 e 14,5 bilhões de dólares em 2020 (BLAKE et al., 2020).

2.1.1 Histórico

No ano de 1873, Rivolta e Silvestrini descreveram pioneiramente a *Eimeria avium*. Posteriormente Raillet & Lucet descreveram em 1909, *Coccidium tenellum*, que seria posteriormente conhecido como *Eimeria tenella*. Em 1929 foi descrito por Tyzzer três novas espécies aviárias: *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* e *Eimeria mitis*. No ano de 1930, Johnson descreveu a espécie *Eimeria necatrix* e *Eimeria praecox*. O primeiro caso no Brasil ocorreu em 1936 no estado de São Paulo, *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* e *Eimeria tenella* (REIS, 1936).

Em 1938, Levine descreveu uma nova espécie aviária, denominando-a *Eimeria hagani*, isolada de um pinto dos Estados Unidos, no entanto, ela foi posteriormente considerada uma subespécie da *Eimeria acervulina*.

Em 1942, Levine descreveu outra espécie aviária, a *Eimeria brunetti* e em 1964, Edgar & Siebold descreveram a espécie *Eimeria mivati*, no entanto, não foram mais descritas (KAWAZOE, 2000).

Nos anos 1970, no Brasil, em levantamento de frangos de corte foram identificadas as espécies com as respectivas frequências (%) de ocorrência: *Eimeria acervulina* (36%), *Eimeria maxima* (7%), *Eimeria necatrix* (5%), *Eimeria tenella* (3%) e infecção mista (49%). As espécies

mais frequentes que causam prejuízos em granjas de frango são principalmente a *Eimeria acervulina* e *Eimeria máxima* (KAWAZOE, 2000).

2.1.2 Etiologia

Os oocistos apresentam alta resistência às condições do meio ambiente para favorecer o desenvolvimento do oocisto para o desenvolvimento de quatro esporocistos com dois esporozoítos no interior de cada um, resultando em um oocisto esporulado contendo oito esporozoítos. A esporulação ocorre em condições favoráveis do ambiente como a presença de oxigênio e temperatura (28 a 30°C) por 48-72 horas. Um oocisto pode produzir até 18.000 novos oocistos no interior dos intestinos infectados (DOS SANTOS, 2018).

Ao todo, há 9 diferentes espécies de *Eimeria* descritas em frangos, no entanto, as espécies consideradas patogênicas são 7: *Eimeria acervulina*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria maxima*, *Eimeria mitis*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria praecox* e *Eimeria tenella*. (JANG et al., 2013). As outras duas espécies descritas, *Eimeria hagani* e *Eimeria mivati*, foram previamente descritas em surtos, mas não houve confirmações moleculares dos casos. Infecção por duas ou mais espécies de *Eimeria* pode ser encontrada no mesmo hospedeiro. Contudo, cada uma das espécies tende a causar lesões em diferentes regiões do trato gastrointestinal (KAWAZOE, 2000).

Eimeria acervulina é considerada uma das mais prevalentes em frangos de corte. Ela é de patogenia moderada a severa e costuma acometer a região do duodeno no intestino delgado. *Eimeria necatrix* acomete principalmente o intestino delgado, causando severa enterite, congestão, hemorragia e necrose, ela é mais comum em matrizes e poedeiras comerciais (BASH, 2012).

Eimeria maxima possui patogenia moderada a severa, com lesões similares a *E. necatrix*, mas com a coloração da mucosa mais avermelhada em suas alterações. *Eimeria brunetti* causa enterite na porção final do intestino, reto e ceco. Em casos severos ela pode gerar debris celulares e fibrinogênio na mucosa acometida, dificultando absorção. *Eimeria tenella* é altamente patogênica, causando uma severa tiflíte. É comum o acometimento do ceco e consequente hematoquezia, ela possui altíssima mortalidade. *Eimeria mitis* não tem descrito grandes lesões macroscópicas, no entanto, sua infecção pode causar perdas de performance do lote. *Eimeria praecox* acomete principalmente o duodeno e causa conteúdo intestinal aquoso. Ela também causa fortes prejuízos no ganho de peso das aves (BASH, 2012; FANATICO, 2006).

As principais espécies que acometem perus são *Eimeria adenoiedes*, *Eimeria meleagrimitis*, *Eimeria gallapovonis* e *Eimeria dispersa*. *Eimeria meleagridis* é considerada

prevalente em criações comerciais de perus, ela causa congestão e petéquias no duodeno e dilatação no jejuno. Ela é considerada de patogenia moderada. *Eimeria dispersa* é considerada moderadamente patogênica e acomete principalmente a porção do duodeno. *Eimeria gallapovonis* apresenta baixa patogenicidade e alta virulência sendo considerada espécie responsável por edema e ulceração do íleo com alta mortalidade em aves novas, no entanto, sua prevalência é baixa. *Eimeria adenoides* afeta a porção final do intestino, principalmente no ceco. Suas infecções causam mortalidade em perus jovens, enquanto os adultos apenas diminuem o ganho de peso (BASH, 2012).

2.1.3 Epidemiologia

A coccidiose está presente em todos os setores da avicultura industrial: frangos de corte até matrizes reprodutoras. Ela também acomete as mais diversas espécies de aves como: galinhas, perus, marrecos, codornas, faisões, gansos, pombos, dentre outras. Seus oocistos podem sobreviver até 5 dias na cama, quando 95% estarão esporulados (DOS SANTOS, 2018).

Frangos e perus de todas as idades são susceptíveis à infecção, no entanto, eles tendem a desenvolver resistência após infecções moderadas, possibilitando uma menor susceptibilidade quanto mais velha for a ave. Surtos costumam ser relatados em frangos ou perus de 3 a 6 semanas de idade. A infecção quando moderada é autolimitante e leva a imunidade e resistência das aves. No entanto, não há evidências de imunidade entre espécies. São raros os casos de surtos em poedeiras e matrizes adultas por conta da possível prévia exposição e imunidade adquirida a coccidiose. (BASH, 2012; CHAPMAN et al., 2008).

Coccidioses são doenças de transmissão oro-fecal sendo oocistos imaturos eliminados pelas fezes das aves fontes de infecção que sobrevivem mais ou menos tempo no meio ambiente de acordo com as condições de umidade e temperatura que propiciam a evolução para a forma esporulada contendo taquizoitos que são as formas infectantes. Assim, oocistos nas fezes se tornam infectantes em aproximadamente 2 dias. Aves infectadas liberam os oocistos por dias ou semanas (CHAPMAN et al., 2008).

A coccidiose é um quadro de transmissão indireta pela participação de vetores mecânicos como mosca doméstica, carreadores mecânicos como roedores, cascudinhos e fômites dentre os quais pode-se citar a vestimenta de funcionários, objetos, equipamentos, veículos etc. A cavidade oral é única porta de entrada de oocistos no organismo de aves suscetíveis que se infectam pela ingestão de oocistos esporulados. (FANATICO, 2006; SWAYNE, 2020).

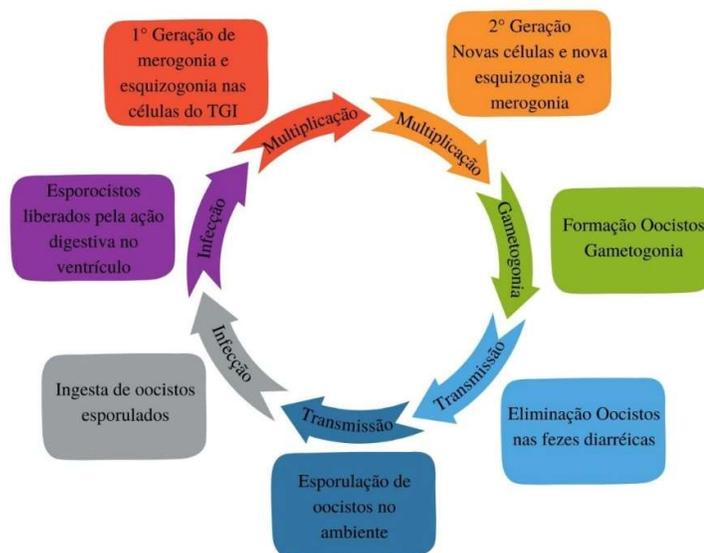
Os oocistos são considerados resistentes às condições do meio ambiente e aos desinfetantes. No entanto, o calor da cama durante o alojamento, a presença de amônia e de bactérias são considerados fatores adversos para sua sobrevivência (SWAYNE, 2020).

A prevenção é difícil de ser alcançada em razão da complexa epidemiologia e consequentemente, nas regiões endêmicas, o controle é realizado pela aplicação de medidas de biossegurança objetivando mitigar fatores de risco, imunização ativa pelo emprego de vacinas e tratamento em caso de ocorrência da doença ((DOS SANTOS, 2018).

2.1.4 Ciclo

Protozoários do gênero *Eimeria* completam seu ciclo em apenas um hospedeiro e possuem dois estágios: assexuado e sexuado conforme ilustrado na Figura 1. Os oocistos esporulados são observados no ambiente do galpão na cama e na água de bebida contaminada com oocistos. O ciclo biológico tem início após serem ingeridos pelo frango, os esporozoítos são excistados dos esporocistos por ação mecânica que se que ocorre desde os estômagos mecânicos até o duodeno, quando então penetram nas células epiteliais e se transformam em trofozoítos (KAWAZOE, 2000).

Figura 1 – Ciclo de vida da Coccidiose



Fonte: Adaptado de dos Santos (2018)

O núcleo inicia divisões mitóticas sucessivas dentro de um meronte, prosseguindo seu desenvolvimento com a divisão do citoplasma do merozoíto e um novo ciclo merogônico se repete por duas ou mais gerações de acordo com a espécie para então iniciar a fase sexuada por

um processo de gametogonia. Um merozoíto penetra numa célula onde ocorre a divisão nuclear e a formação dos microgametas dentro de um microgametócito e outro merozoíto penetra em outra célula, não ocorre divisão celular ou nuclear, mas desenvolve-se atingindo o tamanho da célula hospedeira contendo um núcleo grande para dar origem ao macrogameta. O núcleo do microgameta se funde com o núcleo do macrogameta dando origem ao zigoto que forma a parede cística do oocisto. O oocisto então alcança a luz intestinal e é eliminado para o meio ambiente. (ALLEN & FETTERER, 2002).

2.1.4 Imunidade

A resposta imune na coccidiose se inicia na ativação de receptores *Toll like* (TLR), sendo os TLR4, TLR5, TLR7 e TLR21 no ceco; e TLR3 e TLR5 no duodeno. Ela é expressa no início da infecção, durante a fase assexuada do ciclo da *Eimeria* sp. (GAGHAN et al., 2022). Em geral, o desenvolvimento da imunidade de uma espécie de *Eimeria* não garante imunidade adaptativa para as demais espécies, salvo alguns casos como, por exemplo, *Eimeria maxima* e *Eimeria brunetti*, assim como *Eimeria tenella* e *Eimeria necatrix* (ROSE et al., 1967). A infecção primária com resistência por parte do hospedeiro foi demonstrada estar associada com respostas inflamatórias rápidas como aumento do número de granulócitos, aumento do estresse oxidativo, aumento da atividade de células Natural Killer (NK), produção de citocinas inflamatórias como IFN- γ , resposta mais rápida de células T. No entanto, de todos os parâmetros em roedores, frangos e perus apenas dois, linfócitos e IFN- γ , demonstraram ser indispensáveis para a resistência a coccidiose (OVINGTON & SMITH, 1992; CHAPMAN et al., 2013).

A imunidade natural contra *Eimeria* sp. se inicia na imunidade da mucosa, nos tecidos linfoides associados ao intestino (BREMMER et al., 2022). Seu propósito é proteger o organismo do frango de antígenos perigosos os destruindo antes que se desenvolvam em infecções sistêmicas e, com isso, acaba sendo a primeira linha de defesa contra a *Eimeria* (CHAPMAN et al., 2013). A resposta imune aos agentes estranhos reguladas pelos tecidos linfoides associados ao intestino ocorre por mecanismos complexos como secreção de citocinas e estimulação linfoide. Os tecidos linfoides associados ao intestino possuem linfócitos B, linfócitos T, com uma participação crítica na imunidade adquirida contra coccidiose aviária. Da mesma forma, muitas citocinas participam da resposta imune ao quadro, uma produção aumentada de principalmente Interferon Gama (IFN- γ), interleucina 10 (IL-10) e interleucina 21 (IL-21) foram associados em diversos estudos com frangos desafiados com *Eimeria*

vermiformis animais resistentes a infecção (HORNINK & KAWAZOE, 2020; HAWKEN et al., 2021; LEE et al., 2022).

Rose & Millard (1985) observaram uma grande participação dos linfócitos T na resposta imune a coccidiose uma vez que roedores sem timo apresentaram maior susceptibilidade à infecção por *Eimeria vermiformis*. Dentre as células T, a T CD4 demonstrou maior importância imunológica à coccidiose em relação a T CD8. Associa-se estes dados por T CD4 ser fonte de IFN- γ que é um grande responsável pela resistência ao agente patogênico. GADDE et al. (2011) observou maior atividade de IFN- γ e IL10 em perus pós-infecção por *Eimeria adenoides*. Galinhas tratadas com IFN- γ recombinante obtiveram melhor ganho de peso em relação ao controle, além de liberarem menos oocistos nas fezes (LOWENTHAL et al., 1997). IL-10 por sua vez é uma citocina anti-inflamatória que regula a resposta inflamatória de outras citocinas como IL-1B e IL-6. Em roedores, valores reduzidos de IL-10 causaram maior susceptibilidade a infecção por toxoplasmose. Nas galinhas a sua presença é importante para reduzir a resposta inflamatória exacerbada e fatal à *Eimeria sp.* contra a mucosa intestinal (LEE et al., 2022). Na imunidade adaptativa, no entanto, observou-se que não há tanta participação de T CD4 e uma maior de T CD8, uma vez que sua depleção causou aumento da susceptibilidade ao segundo desafio por *Eimeria vermiformis* (ROSE et al., 1992).

Fator de necrose tumoral é produzido por macrófagos ativados mas também por outras células Natural Killers, mastócitos e linfócitos T. A maior função desta citocina é recrutar heterófilos para o sítio de infecção, sua produção foi observada como dose dependente após infecção com *E. tenella* em macrófagos de galinhas. Em experimento *in vivo* com frangos desafiados com *E. tenella*, observou-se menor perda de peso nos animais que foram tratados com anticorpos anti-TNF (LEE et al., 2022).

2.1.5 Patogenia

As Eimerias apresentam tropismo pelas vilosidades intestinais causando redução de sua altura que adquire aparência de mucosa plana, com diminuição da capacidade de absorção, além de causar destruição de células epiteliais do intestino resultando na perda de fluidos, hemorragia e susceptibilidade a outras doenças (PENHA et al., 2008). Estes fatores acarretam alterações frequentes como diarreia de mucóide a sanguinolenta, desidratação, anemia, despigmentação e prostração. Eimerias que acometem mais superficialmente a mucosa, como a *Eimeria acervulina*, tendem a causar problemas mais frequentes nas vilosidades, enquanto aquelas de localização mais profunda, como a *Eimeria tenella*, tendem a evoluir para quadros hemorrágicos. A ave pode apresentar também um quadro com baixo limiar de manifestação

clínica observada por baixo comprometimento de desempenho (ADJEI-MENSAH & ATUAHENE, 2022). O quadro, por vezes, pode ser autolimitante diante da resposta imune, que pode ser mais eficaz na segunda exposição ao agente etiológico (PENHA et al., 2008).

2.1.6 Lesões

A avaliação de lesões à necropsia e exame histopatológico principalmente do trato gastrointestinal do animal, pode-se associar a região acometida com a espécie de *Eimeria sp.*. Cada uma tende a favorecer uma região do trato gastrointestinal para se instalar, como, por exemplo, a *Eimeria tenella* são mais encontradas no ceco, enquanto a *Eimeria acervulina*, no duodeno. Apesar de todas serem de alta importância para a avicultura, a *Eimeria necatrix* e *Eimeria tenella* são consideradas altamente patogênicas e virulentas (JANG et al., 2013). As lesões estão descritas na tabela 1, tabela 2 e tabela 3 sendo que podem variar de pequenas petéquias na superfície até lesões coalescentes, parede intestinal alargada, presença de exsudato no lúmen, sangue digerido e odor pútrido. Microscopicamente, pode-se observar inflamação (enterite), destruição das vilosidades e presença dos oocistos no epitélio de revestimento (JOHNSON & REID, 1970).

Tabela 1; Descrição dos escores de lesão intestinal em frangos de corte causados pelas *Eimeria acervulina*.

Escore de lesão	<i>Eimeria acervulina</i>
0	Ausência de lesões
1	Pontos ou estrias brancas, vistas da serosa ou mucosa, esparsas (até cinco por centímetros quadrado) e no duodeno.
2	Pontos ou estrias brancas mais numerosas, mas não coalescentes, que se estendem, entre duodeno e divertículo. Conteúdo intestinal normal.
3	Pontos ou estrias brancas já coalescendo com redução de tamanho, que se estendem até o divertículo. Parede intestinal engrossada e conteúdo intestinal aquoso.
4	Pontos ou estrias brancas completamente coalescentes, dando à mucosa do intestino coloração acinzentada. Presença de lesões típicas somente no intestino médio. Parede intestinal engrossada e conteúdo cremoso.

Fonte: Johnson & Reid, (1970)

Tabela 2 - Descrição dos escores de lesão intestinal em frangos de corte causados pelas *Eimeria maxima*.

Escore de lesão	<i>Eimeria maxima</i>
0	Ausência de lesões
1	Pontos ou estrias brancas, vistas da serosa ou mucosa, esparsas (até cinco por centímetros quadrado) e no duodeno.
2	Pontos ou estrias brancas mais numerosas, mas não coalescentes, que se estendem, entre duodeno e divertículo. Conteúdo intestinal normal.
3	Pontos ou estrias brancas já coalescendo com redução de tamanho, que se estendem até o divertículo. Parede intestinal engrossada e conteúdo intestinal aquoso.
4	Pontos ou estrias brancas completamente coalescentes, dando à mucosa do intestino coloração acinzentada. Presença de lesões típicas somente no intestino médio. Parede intestinal engrossada e conteúdo cremoso.

Fonte: Johnson & Reid, (1970)

Tabela 3 - Descrição dos escores de lesão intestinal em frangos de corte causados pelas *Eimeria tenella*.

Escore de lesão	<i>Eimeria tenella</i>
0	Ausência de lesões
1	Pontos ou estrias brancas, vistas da serosa ou mucosa, esparsas (até cinco por centímetros quadrado) e no duodeno.
2	Pontos ou estrias brancas mais numerosas, mas não coalescentes, que se estendem, entre duodeno e divertículo. Conteúdo intestinal normal.
3	Pontos ou estrias brancas já coalescendo com redução de tamanho, que se estendem até o divertículo. Parede intestinal engrossada e conteúdo intestinal aquoso.
4	Pontos ou estrias brancas completamente coalescentes, dando à mucosa do intestino coloração acinzentada. Presença de lesões típicas somente no intestino médio. Parede intestinal engrossada e conteúdo cremoso.

Fonte: Johnson & Reid, (1970)

2.1.7 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da coccidiose é conduzido a partir do histórico de diarreia e/ou hematoquezia, perda de peso, anemia e prostração. O aspecto das fezes pode ser sugestivo para algumas espécies de *Eimeria*. Por exemplo: fezes diarreicas com aspecto de massa de tomate podem ser sugestivas de *Eimeria tenella* e *Eimeria necatrix*, enquanto aspecto mucoide pode ser sugestivo para *Eimeria acervulina* e *Eimeria maxima* (DOS SANTOS, 2018). Oocistos característicos podem ser encontrados em exame coproparasitológico com a técnica de Willis-Mollay, Sheather e Hoffman. Conforme mencionado anteriormente, é possível direcionar o diagnóstico através das lesões encontradas durante a necropsia e pela pesquisa de oocistos em secções das alças intestinais no exame histopatológico (FERNANDES et al., 2018). O diagnóstico também pode ser realizado com PCR multiplex a partir de amostra de fezes frescas ou conteúdo intestinal (BALESTRIN et al., 2022).

2.1.8 Tratamento

O controle das coccidioses aviárias vem sendo conduzido, na fase inicial do surto tão logo são observados os primeiros sinais da doença, pela quimioterapia associada ou não a sulfonamidas, ou outros compostos. Alguns exemplos dos principais produtos utilizados são sulfonamidas, nicarbazin, clopidol, quinolonas e amprólio (DOS SANTOS, 2018).

O conceito de prevenção medicamentosa surgiu a partir da investigação que revelou que a coccidiose já se encontrava disseminada no plantel quando primeiros sinais clínicos decorrentes de lesões graves eram observados (CERVANTES et al, 2020).

O tratamento farmacológico da coccidiose pode ser conduzido de forma preventiva ou de controle logo após ao aparecimento das manifestações clínicas. A sua aplicação deve ser interrompida uma semana antes do abate ou para uso de ovos comerciais para evitar o acúmulo de resíduos. O emprego preventivo contínuo conduziu à seleção de espécies de *Eimerias* resistentes aos fármacos, tornando o tratamento menos eficiente quando comparados aos resultados obtidos no início do tratamento (FANATICO, 2006). Outro malefício do uso de fármacos para o tratamento da coccidiose é o fato de comprometerem a instalação da imunidade natural nas aves, além da geração de resíduos em sua carne necessitando de um período de carência pré-abate. Em decorrência desses fatores, é crescente a demanda por produtos naturais que não impliquem em gerar resíduos nos animais tratados e auxiliem na sua imunidade (LEE et al., 2022).

2.1.9 Prevenção e Controle

Procedimentos mais comum de prevenção da coccidiose é o emprego de vacinas que podem ser vivas ou atenuadas que vem apresentando sucesso na indústria avícola, porém com algumas limitações como alto custo de produção, disponibilidade limitada e surgimento de estirpes cada vez mais resistentes e que vem sendo preterido pelas vacinas recombinantes. Tian et al. (2017) avaliaram a ação do gene GAPDH clonado de *Eimeria acervulina* e *Eimeria maxima* em galinhas posteriormente infectadas com *Eimeria tenella*, *Eimeria acrvulina* e *Eimeria maxima*. As aves vacinadas apresentaram uma maior secreção de citocinas (IFN- γ , IL-2, IL-4) e maior produção de anticorpos IgG, além de melhores resultados em ganho de peso e menor liberação de oocistos nas fezes.).

A profilaxia, representada pelas medidas de biosseguridade, está sendo comprometida pelo aumento da lotação dos galpões, natureza da construção e ventilação que favorecem o aumento de umidade da cama, tipo de ração resultante em fezes mais líquidas e emprego de medicamentos que vem reduzindo sua eficácia em razão da resistência que induz nas aves (HORNINK & KAWAZOE, 2020).

Além dos métodos convencionais, algumas alternativas surgiram ao longo dos anos como anticorpos de gema de ovo hiperimune, fitoterápicos, probióticos, prebióticos e ácidos orgânicos. Todos sendo alternativas a antibióticos visando contornar as cepas resistências e sem a geração de resíduos nos frangos (GADDE et al., 2017; LEE et al., 2022).

2. 2 METILXANTINA

Metilxantina é um alcalóide purínico lipossolúvel encontrado em várias fontes vegetais como o cacau, guaraná, café, chá-preto, erva-mate, e noz-de-cola, importante na indústria alimentícia e farmacêutica (OÑATIBIA-ASTIBIA et al., 2016; PAGLIARI et al., 2022). É também encontrada em diversas plantas como *Camellia ptilophylla*, *Paulliania cupana* ou *Citrus sp.*, que são utilizados para preparo de suplementos dietéticos (ASHIHARA & SUZUKI, 2004). Por um longo período no século XX houveram tentativas de elucidar os riscos do uso de cafeínas, no entanto, surpreenderam ao demonstrarem evidências de serem benéficas contra doenças crônicas e degenerativas como Parkinson, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (FREDHOLM, 2010). São inúmeros os benefícios relativos à modulação da imunidade inata e adaptativa, revelando ser potencial agente para prevenção e tratamento de diversos patógenos em razão de seu largo espectro de ação. Metilxantina foi relatada como auxiliar no quadro de diversas doenças desde respiratórias até neurodegenerativas (ONASTIBIA-ASTIBIA et al.,

2017), além de já ter sido demonstrado seu potencial analgésico em fármacos como a aspirina (SAWYNOK et al., 2017).

Sua metabolização se inicia após administração por via oral, onde é absorvida pelo trato gastrointestinal de forma rápida, alcançando quase 100% de biodisponibilidade. Ao atingir a corrente sanguínea, conecta-se à albumina e é transportada para diversos tecidos por mecanismo de difusão simples. Sua metabolização é ao nível hepático e mediada pela isoenzima 1^a2 do citocromo P450, responsável pela sua concentração plasmática. A sua meia vida é de 4,1 horas, mas pode ser mais longa em pacientes com doença hepática e neonatos. Os metabólitos resultantes da cafeína são paraxantina, teobromina e teofilina, excretadas em mamíferos pela via urinária.

Relativamente aos benefícios da metilxantina na imunidade inata, existem várias evidências de que a cafeína e seus metabólitos podem modular a imunidade inata e adaptativa, exercendo papel tanto inflamatório quanto anti-inflamatório dependendo da dose e concentração endógena da adenosina presente no local da inflamação (Horrigan et al. (2006). Também foi demonstrada pela produção de citocinas como IL-1 β e IL-10 (VAN FURTH et al., 1995; KOVACS et al., 2021), a proliferação de linfócitos (HORRIGAN et al., 2005).

Os linfócitos T CD4 e a citocina expressada em animais resistentes e/ou vacinados para coccidiose como a IL10 já foram associados ao efeito benéfico da metilxantina observados na medicina humana (HORRIGAN et al., 2006). Quando ingerida, proporciona o aumento da população de linfócitos T CD4 e da citocina aumentando a concentração intracelular de AMPc que é um potente imunomodulador, suprimindo citocinas pro-inflamatórias como TNF-a e IL12, assim como reduzindo a produção exagerada de espécies reativas de oxigênio (antioxidante) (DENT & RABE, 1996) podendo garantir um menor grau de lesão na mucosa intestinal (VAN FURTH et al., 1995; KOVACS et al., 2021).

A metilxantina também possui a capacidade de antagonizar os receptores de nervos periféricos Adenosina A2a e A2b com potencial analgésico, diminuindo algumas consequências do quadro como a anorexia e apatia (MULLER & JACOBSON). Paralelamente, existem relatos de que sua suplementação em frangos de corte acelera seu crescimento sem necessariamente aumentar o consumo de ração, com uma possível associação com a diminuição do consumo basal de energia devido à redução da atividade da tireoide (KAMELY et al., 2016).

Portanto, como a metilxantina induz respostas do organismo similares às respostas imunes de animais que demonstram resistência a coccidiose, este trabalho tem como objetivo utilizar a metilxantina frente a infecção de coccidiose por *Eimeria acervulina* e *Eimeria tenella* para controle de suas lesões e perdas de performance.

1 **3. MANUSCRITO**

2

3

4

TÍTULO

5

Effect of methylxanthine against coccidiosis in broiler

6

F.Y. Shibuya^{a,*}, M.M. Ishizuka^c, G.D. Kommers^b, V.C.T. Barraza^b, L.I de Freitas^a, G.M. Andrade^a, P.
7 Dilkin^a, H.F. dos Santos^a

8

9

10

Manuscrito será submetido à revista Avian Pathology

11

12

13 **Original Article**

14

15 Effect of methylxanthine against coccidiosis in broiler

16 F.Y. Shibuya^{a,*}, M.M. Ishizuka^c, G.D. Kommers^b, V.C.T. Barraza^b, L.I de Freitas^a, G.M. Andrade^a, P.17 Dilkin^a, H.F. dos Santos^a

18

19 ^a *Department of Preventive Medicin Veterinary, Federal University of Santa Maria, Rio*
20 *Grande do Sul, Brazil*21 ^b *Department of Veterinary Pathology, , Federal University of Santa Maria, Rio Grande do*
22 *Sul, Brazil*23 ^c *Department of Preventive Medicin Veterinary and Animal Health, University of São Paulo,*
24 *São Paulo, Brazil.*

25

26

27

28 * Corresponding author. Tel.: 11 98314-7817

29 *E-mail: fabioshibuya@hotmail.com (F.Y Shibuya).*

30

31 Abstract

32 Coccidiosis is a common disease in poultry industry and the etiology is *Eimeria* sp. The disease is known
33 for its enteric lesions, reduction of the intestinal epithelium reducing the poultry growthing and
34 increasing mortality. The poultry industry is demanding for alternative and natural products in order
35 to treat and/or control avian diseases. Methylxanthine is an alcaloid with stimulant properties and
36 extracted from coffee, tea, chocolate, cocoa tea, guarana or citrus sp. There are several benefits of its
37 use such as the immunomodulatory potential in innate and adaptative immunity like stimulating the
38 production of some cytokines in response to coccidiosis infection. The objective of this study was to
39 evaluate the efficacy of Methylxanthine in the *Eimeria acervuline* and *Eimeria tenella* control.
40 Therefore, we compared 60 chicks separated in 3 treatments and maintained for 28 days. Group T
41 (negative control); Group T2 (infected with *Eimeria acervuline* and *Eimeria tenella*); and Group T3
42 (infected with *Eimeria acervuline* and *Eimeria tenella* and treated with Methylxanthine dilutes in water
43 (30 ml/L). At 28 days of observation, performance data was obtained and the chicken were euthanized.
44 At the necropsy, intestines and cecum samples were submitted to histopathological analysis. The
45 Methylxanthine treatment reduced the performance losses and intestinal lesions from *Eimeria*
46 *acervuline* and *Eimeria tenella* as observed in the treated group (T3). The treatment with
47 Methylxantine proved efficacy in the infection control of coccidiosis in broiler.

48

49 Keywords: *Eimeria acervulina*, *Eimeria tenella*, Coccidiosis, Methylxanthine, Broiler .

50 **Introduction**

51 Coccidiosis is a common disease in poultry industry which is caused by parasites of the genus
52 *Eimeria* and the class *Sporozoa*. It causes several intestines lesions and other tissues such as kidney
53 and liver (Acharya, K.P. & Acharya, N., 2017; Franson et al., 1981). The annual economic losses are
54 estimated to be around 14,5 billion dollars (Blake et al., 2020).

55 The clinical signs of coccidiosis begins after the poultry are exposed to the sporulated oocysts
56 and the condition is aggravated when the host is stressed and/or immunosuppressed (Chanie et al.,
57 2009). Following its infection, the parasite propagate inside the epithelial cells in the gut tissues
58 leading to its destruction, hemorrhage and death (Nabian et al., 2018). Control of coccidiosis is
59 achieved through anticoccidial drugs, such as sulfonamides, nicarbazin, clopidol, quinolones and
60 amprolium (Adewole, 2012; Chapman et al., 2013).

61 Immune response to coccidiosis is innate and adaptative, primally conducted by lymphocytes
62 T CD4 that releases cytokines like the interferon-gamma (IFN- γ). Interleukin 10 (IL 10) is another
63 important cytokine which regulates the inflammatory action of other cytokines like interleukin 1B
64 and interleukin 6B that may cause gut lesion (Chapman et al., 2013). Vaccination with live or live-
65 attenuated oocysts is the main control of *Eimeria*. Vaccinated chicks tend to express citokynes like
66 interferon-gamma and have higher production of antibodies like immunoglobulin G (Tian et al.,
67 2017). However, resistance to anticoccidial drugs and vaccination increased the search for alternative
68 products to control coccidiosis (Chapman et al., 2013).

69 Natural products with little to no side effects on poultry are a viable alternative. Among them
70 we can mention the probiotics, organic accids and plant extracts in order to reduce the lesions by
71 coccidiosis (Chapman et al., 2013; Gadde et al., 2017). Between the natural products, there is the
72 methylxanthine which is an liposoluble alkaloid found in various vegetable sources like guarana,
73 coffee, black tea, mate herb and cocoa. Methylxanthine has been of great importance in food
74 industry for many decades since it has been described many benefits on immunomodulation and

75 being a good treatment for degenerative conditions like asthma, heart diseases and Alzheimer's
76 disease (Ashihara & Suzuki, 2004; Onatibia-Astibia et al., 2016; Pagliari et al., 2022). Methylxanthines
77 show activity as antagonists of receptors *Toll like* A1, A2a and A2b, providing a analgesic potential
78 when administered in doses of 35-100 mg/kg in rodents(Siegers, 1973).

79 The objective of the current study is to evaluate the efficacy of methylxanthine extracted
80 from mate's herb to maintain the performance and control microscopic intestinal lesions of
81 coccidiosis in broiler.

82

83 **Materials and methods**

84 *Experimental design*

85 The study was done in the experimental aviary of Samitec Institute (Analitics, microbiological
86 and technological solutions) and the LCDPA (Central Laboratory of diagnostic of Avian Pathology) of
87 the University in the city of Santa Maria in the state of Rio Grande do Sul – Brazil. 1 day commercial
88 Cobb mixed chicks were placed in the aviary divided in areas of 1 m².

89 Sixty chicks were separated into three groups designated as Control (T1), one group was
90 inoculated orally with 20.000 oocysts of *Eimeria acervulina* and 4.500 oocysts of *Eimeria tenella* (T2),
91 and one group was inoculated orally with 20.000 oocysts of *Eimeria acervulina* and 4.500 oocysts of
92 *Eimeria tenella* and treated with methylxanthine (solution of 0.0105 g/L diluted in drinking water 30
93 ml/L) (T3). Data of performance was obtained at days 14 and 18.

94

95 The inoculation occurred withing 18 days old and the oocysts incubated in the broiler until day
96 25 when the treatment with methylxanthine began in T3. All animals were killed by cervical dislocation
97 within 28 days old.

98

99 *Necrópsia e Histopatológico*

100 At necropsy , the duodenum, jejunum, ileum and cecum were collected from 2 animals per
101 group and fixated in formaldehyde 10%. The samples were histologically processed and colored in
102 hematoxylin-eosin stain as described by Wang et al. (2019).

103 *Análise estatística*

104 Data of body weight were submitted to analysis of variance and Tukey test at 5% significance
105 level.

106

107 **Results and discussion**

108 Body weight data and weight gain are listed in table 1. There were no difference between
109 treatments within the weight gain ($p < 0.05$). However, at 28 days T2 showed the lowest body weight
110 of the three groups. This data is visible due to the damage in gut tissue caused by *Eimeria tenella* and
111 *Eimeria acervuline* resulting in lesser enzymatic activity in the intestines and lower absorption of
112 nutrients (Hansen et al., 2021). Methylxanthine treatment (T3) reduced the impact of *Eimeria* infection
113 and maintained similar body weight as the control group (T1). This results can be associated with the
114 antioxidant and anti-inflammatory capacity of the methylxanthine, providing a better intestinal quality
115 of broiler and leading to a better nutrients absorption and weight gain (Kamekly et al. 2016; Vieira et al.
116 2020). Methylxanthine supplementation in broiler has already showed growth acceleration
117 maintaining the feed intake due to the reduction of thyroid activity and basal energy consumption
118 (Kamekly et al., 2016). Methylxanthine also antagonize pain receptors Adenosin A2a and A2b, allowing
119 the animal to feel less pain and maintaining some consequences of the infections such as apathy and
120 reduction of feed intake (Kamekly et al., 2016).

121 Histopathological analysis of the sections of the intestines and cecum can be visualized in
122 Figure 1. It was verified in the analysis that all treatments had enteritis. However, T1 and T3 did not
123 have any parasite (morphologically compatible with *Eimeria sp.*) observed in the evaluated sections.
124 Inversely, T2 was observed lesions and findings compatible with coccidiosis and parasites
125 (macrogametes, microgametes and oocysts) in the epithelium, lymphohistioplasmacytic infiltrate in
126 lamina propria, dilated crypts with heterophils. Methylxanthine prevented characteristic lesions in the
127 sections evaluated of T3 that were visible in T2. Natural immunity to *Eimeria sp.* starts with the
128 activation of gut associated lymphoid tissues (Bremmer et al., 2022; Chapman et al., 2013). It has been
129 stated that broilers resistant to *Eimeria vermiformis* has activation of many cytokines related to the
130 immune response (Hornink & Kawazoe, 2020; Hawken et al., 2021; Lee et al., 2022). It is implied that
131 methylxanthine acts in the activation e concentration of cytokines managing gut immunity preventing
132 the infection by *Eimeria sp.* like occurred in T3. Horrigan et al. (2006) mentioned that lymphocytes T
133 CD4 and interleukin 10 are expressed in resistant animals to coccidiosis. The mechanism consists in the
134 increase of intracellular concentration of cyclic adenosine monophosphate which is considered an
135 important immunomodulator, suppressing the inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor
136 alpha and interleukin 12. Also, it reduces the production of reactive oxygen species (Dent & Rabe,
137 1996). Methylxanthine used in our experiment acted reducing the lesion in the intestines and
138 maintained the performance like the group control (T1) (Van Furth et al., 1995; Kovacs et al., 2021). It
139 can be concluded that the methylxanthine prevented intestinal lesion of *Eimeria acervulina* and
140 *Eimeria tenella* in broilers.

141

142 **Conclusions**

143 In this study, it was verified the beneficial effect of methylxanthine in broilers in weight gain
144 and prevention of intestinal lesions of coccidiosis. The use of methylxanthine has not been previously
145 described for *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella*.

146

147 **Conflict of interest statement**

148 There were no conflict of interests in this study.

149 **Acknowledgements**

150 The presente study was done with the support of Coordenação de Aperfeiçoamento de
 151 Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Financial code 001. By the Centro de Amparo à Pesquisa
 152 Veterinária/Amparo-SP for donating samples of *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella*. To the Brasil
 153 Pharma Flora for donating the sample of methylxanthine.

154

155

156 **References**

- 157 Acharya, K.P., and n. Acharya. (2017). Alternatives to fight against coccidiosis: a review.
 158 Nepalese Vet. J. 34:152-167
- 159 Adewole, S. O. (2012). The efficacy of drugs in the treatment of coccidiosis in chicken in
 160 selected poultries. Academic Research International, 2(1), 20-24.
- 161 Ashihara, H., & Suzuki, T. Distribution and biosynthesis of caffeine in plants. Frontiers in
 162 Bioscience-Landmark, 9(2), 1864-1876. 2004.
- 163 Blake, D. P., Knox, J., Dehaeck, B., Huntington, B., Rathinam, T., Ravipati, V. & Tomley, F.
 164 M. Re-calculating the cost of coccidiosis in chickens. Veterinary Research, 51(1), 1-
 165 14. 2020.
- 166 Cai, H., Luo, S., Zhou, Q., Yan, Z., Liu, Q., Kang, Z., Liao, S., Li, J., LV, M., Lin, X., Hu, J.,
 167 Yu, S., Zhang, J., QI, N. & Sun, M. (2022). Effects of Bacillus subtilis and coccidiosis
 168 vaccine on growth indices and intestinal microbiota of broilers. Poultry Science,
 169 101(11), 102091.
- 170 Chapman, H. D., Barta, J. R., Blake, D., Gruber, A., Jenkins, M., Smith, N. C., & Tomley, F.
 171 M. (2013). A selective review of advances in coccidiosis research. Advances in
 172 parasitology, 83, 93-171. Hansen, V. L., Kahl, S., Proszkowiec-Weglarz, M., Jiménez,
 173 S. C., Vaessen, S. F., Schreier, L. L.& Miska, K. B. (2021). The effects of tributyrin
 174 supplementation on weight gain and intestinal gene expression in broiler chickens
 175 during *Eimeria maxima*-induced coccidiosis. Poultry Science, 100(4), 100984.
- 176 Chapman, H. D. (2008). Coccidiosis in the turkey. Avian Pathology, 37(3), 205-223.
- 177 Dent, G., & Rabe, K. (1996). Effects of theophylline and non selective xanthine derivatives
 178 on PDE isoenzymes and cellular function. Handbook of immu nopharmacology:
 179 phosphodiesterase inhibitors. Academic, San Diego, 41.

- 180 Franson, J. Christian; Derksen, Dirk V. Renal coccidiosis in oldsquaws (*Clangula hyemalis*)
181 from Alaska. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 17, n. 2, p. 237-239, 1981.
- 182 Gadde, U., Kim, W. H., OH, S. T., & Lillehoj, H. S. (2017) Alternatives to antibiotics for
183 maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review. *Animal*
184 *health research reviews*, 18(1), 26-45.
- 185 Gaghan, C., Adams, D., Mohammed, J., Crespo, R., Livingston, K., & Kulkarni, R. R..
186 (2022). Characterization of vaccine-induced immune responses against coccidiosis in
187 broiler chickens. *Vaccine*.
- 188 Hawken, R., Kaiser, P., & Vervelde, L. (2021). Kinetics of the Cellular and Transcriptomic
189 Response to *Eimeria maxima* in Relatively Resistant and Susceptible Chicken Lines.
- 190 Horrigan, L. A., Kelly, J. P., & CONNOR, T. J. (2005). Caffeine and its major metabolite
191 paraxanthine suppress human lymphocyte function. *Ir J Med Sci*, 174(2; es4), 26.
- 192 Horrigan, L. A., Kelly, J. P., & CONNOR, T. J. (2006). Immunomodulatory effects of
193 caffeine: friend or foe?. *Pharmacology & therapeutics*, 111(3), 877-892.
- 194 Johnson, J.; Reid, W. M.. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-
195 pen experiments with chickens. *Experimental parasitology*, v. 28, n. 1, p. 30-36, 1970.
- 196 Kamely, M., Torshizi, M. A. K., & Rahimi, S. (2016). Blood biochemistry, thyroid hormones,
197 and performance in broilers with ascites caused by caffeine. *Poultry Science*, 95(11),
198 2673-2678.
- 199 Kovács, E. G., Alatshan, A., Budai, M. M., Czimmerer, Z., Bíró, E., & Benko, S. (2021).
200 Caffeine has different immunomodulatory effect on the cytokine expression and
201 NLRP3 inflammasome function in various human macrophage subpopulations.
202 *Nutrients*, 13(7), 2409.
- 203 Lee, Y., Lu, M., & Lillehoj, H. S. (2022). Coccidiosis: Recent progress in host immunity and
204 alternatives to antibiotic strategies. *Vaccines*, 10(2), 215.
- 205 Muller, C. E., & Jacobson, K. A. (2011). Xanthines as adenosine receptor antagonists.
206 *Methylxanthines*, 151-199.
- 207 Nabian, S., F. Arabkhazaeli, P. Seifouri AND A. Farahani. 2018. Morphometric analysis of
208 the intestine in experimental coccidiosis in broiler treated with anticoccidial drugs. *Ira*
209 *J. Parasitol.* 13:493-499
- 210 Onatibia-Astibia, A., Martinez-Pinilla, E., & Franco, R. (2016). The potential of
211 methylxanthine-based therapies in pediatric respiratory tract diseases. *Respiratory*
212 *medicine*, 112, 1-9.
- 213 Pagliari, S., Celano, R., Rastrelli, L., Sacco, E., Arlati, F., Labra, M., & Campone, L. (2022).
214 Extraction of methylxanthines by pressurized hot water extraction from cocoa shell
215 by-product as natural source of functional ingredient. *LWT*, 170, 114115.
- 216 Sawynok, J. Methylxanthines and pain. *Methylxanthines*, p. 311-329, 2011.
- 217 Siegers, C.P. (1973) Effects of caffeine on the absorption and analgesic efficacy of
218 paracetamol in rats. *Pharmacology* 10:19 27
- 219 Van Furth, A. M., Seijmonsbergen, E. M., Langermans, J. A., Van Der Meide, P. H., & Van
220 Furth, R. (1995). Effect of xanthine derivatives and dexamethasone on *Streptococcus*
221 *pneumoniae*-stimulated production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta
222 (IL-1 beta), and IL-10 by human leukocytes. *Clinical Diagnostic Laboratory*
223 *Immunology*, 2(6), 689-692.
- 224 Vieira, A. J., Gaspar, E. M., & Santos, P. M. (2020). Mechanisms of potential antioxidant
225 activity of caffeine. *Radiation Physics and Chemistry*, 174, 108968.
- 226 Williams, R. B. (2005). Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational,
227 integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian pathology*,
228 34(3), 159-180.
- 229

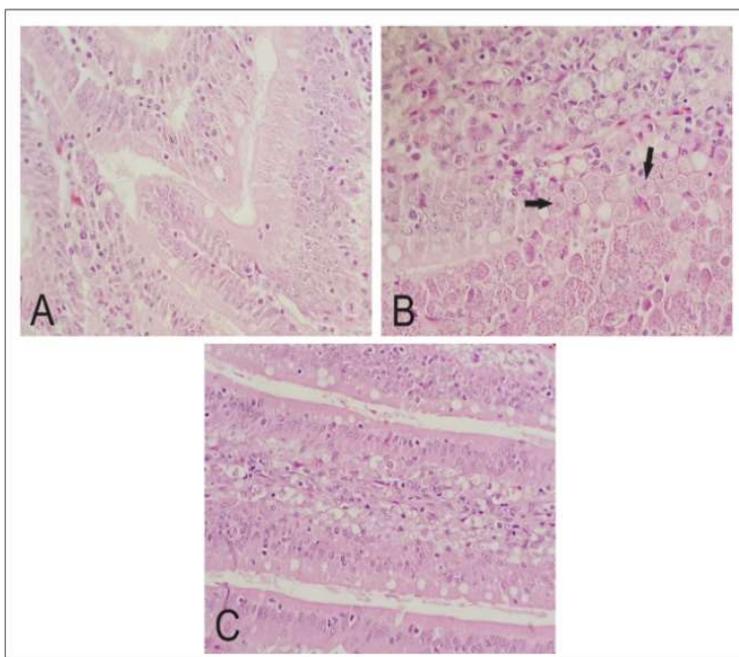
230 **Figura 1**

231

232 A – Controle (T1): intestino com criptas levemente dilatadas e contendo heterofilos. B – Grupo inoculado com
233 *Eimeria acervulina* e *Eimeria tenella* (T2): presença de organismos protozoários (oocistos – setas) no epitélio de
234 revestimento das vilosidades, sugestivo de *Eimeria acervulina*. C - Grupo Inoculado com *Eimeria acervulina* e
235 *Eimeria tenella* e tratado com Metilxantina (T3): intestinos com inflamação linfoplasmocítica leve, não foram
236 observados agentes compatíveis com *Eimeria*. Coloração de hematoxilina-eosina (HE), aumento 400x

237

238



239

240

241

242

243

244

245

246

247

248 **Tabela 1**

249 Pintinhos segundo peso corpóreo e desvio padrão antes e 28 dias depois da aplicação da Metilxantina e
 250 inoculação de *Eimeria acervulina* e *Eimeria tenella*). Santa Catarina, 2022.

Dias de tratamento	Peso			
	14 dias (g)	28 dias (g)	Ganho de peso (g)	CV (%)
T1	415,0a ± 33,7	1165,0a ± 83,8	750,0A ± 94,3	12,5
T2	395,0b ± 77,5	1065,0b ± 171,7	670,0A ± 168,7	25,1
T3	395,0b ± 83,2	1120,0a ± 237,1	725,0A ± 187,5	25,9

T1: Animais controle; T2: animais inoculados aos 20 dias de idade com 20.000 oocistos de *E. acervulina* e 4.500 oocistos de *E. tenella*; T3: animais não desafiados e sem tratamento.

^{a-c} = letras diferentes na linha entre tratamentos significam diferença estatística pelo teste de Tukey (p<0.05)

*: Desvio padrão

251

252

253

4 CONCLUSÃO

Diante da importância da coccidiose na avicultura e seus impactos nas aves de produção, nosso estudo demonstrou a eficácia do uso de metilxantina. Ela demonstrou evitar a perda performance e lesões em animais infectados por *Eimeria acervulina* e *Eimeria tenella*. As suas propriedades foram efetivas para evitar perdas em performance, sinais clínicos e lesões microscópicas intestinais, sem ser possível observar malefícios de seu uso.

5 REFERÊNCIAS

- ACHARYA, K.P., & N. ACHARYA. Alternatives to fight against coccidiosis: a review. **Nepalese Vet. J.** 34:152-167. 2017.
- ADEWOLE, S. O. The efficacy of drugs in the treatment of coccidiosis in chicken in selected poultries. **Academic Research International**, 2(1), 20-24. 2012.
- ADJEI-MENSAH, B.; ATUAHENE, C. C. Avian Coccidiosis and Anticoccidial Potential of Garlic (*Allium sativum* L.) in Broiler Production: A Review. **Journal of Applied Poultry Research**, p. 100314, 2022.
- ALLEN, Patricia C.; FETTERER, RH118059. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 1, p. 58-65, 2002.
- ALVES, A B.; BRAGAGNOLO, N. Determinação simultânea de teobromina, teofilina e cafeína em chás de cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, 2002
- ARAGÃO, N.M.; VELOSO, M.C.C.; ANDRADE, J.B. validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (clae) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, p. 2476-2481, 2009.
- ASHIHARA, H., & SUZUKI, T. Distribution and biosynthesis of caffeine in plants. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, 9(2), 1864-1876. 2004.
- BALESTRIN, P. W., BALESTRIN, E., SANTIANI, F., CRISTO, T. G. D., PEREIRA, D. G., BONATTO, G. R. & CASAGRANDE, R. A. Comparison of macroscopy, histopathology and PCR for diagnosing *Eimeria* spp. in broiler chickens. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 42. 2022.
- BERCHIERI JR, A.; MACARI, M. Doenças das aves. Campinas: **Facta**, p. 423-428, 2000.
- BLAKE, D. P., KNOX, J., DEHAECK, B., HUNTINGTON, B., RATHINAM, T., RAVIPATI, V., ... & TOMLEY, F. M. Re-calculating the cost of coccidiosis in chickens. **Veterinary Research**, 51(1), 1-14. 2020.
- CAI, H., LUO, S., ZHOU, Q., YAN, Z., LIU, Q., KANG, Z., LIAO, S., LI, J., LV, M., LIN, X., HU, J., YU, S., ZHANG, J., QI, N. & SUN, M. Effects of *Bacillus subtilis* and coccidiosis vaccine on growth indices and intestinal microbiota of broilers. **Poultry Science**, 101(11), 102091. 2022.
- CHAPMAN, H. D., BARTA, J. R., BLAKE, D., GRUBER, A., JENKINS, M., SMITH, N. C. & TOMLEY, F. M. A selective review of advances in coccidiosis research. **Advances in parasitology**, 83, 93-171. Hansen, V. L., Kahl, S., Proszkowiec-Weglarz, M. 2013.

- GADDE, U., KIM, W. H., OH, S. T., & LILLEHOJ, H. S. Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review. **Animal health research reviews**, 18(1), 26-45. 2017.
- GAGHAN, C., ADAMS, D., MOHAMMED, J., CRESPO, R., LIVINGSTON, K., & KULKARNI, R. R.. Characterization of vaccine-induced immune responses against coccidiosis in broiler chickens. **Vaccine**. 2022.
- HAWKEN, Rachel; KAISER, Pete; VERVELDE, Lonneke. Kinetics of the Cellular and Transcriptomic Response to *Eimeria maxima* in Relatively Resistant and Susceptible Chicken Lines. **Frontiers in Immunology**, 2021
- HORRIGAN, L. A., KELLY, J. P., & CONNOR, T. J. Caffeine and its major metabolite paraxanthine suppress human lymphocyte function. **Ir J Med Sci**, 174(2; es4), 26. 2005.
- HORRIGAN, L. A., KELLY, J. P., & CONNOR, T. J. Immunomodulatory effects of caffeine: friend or foe?. **Pharmacology & therapeutics**, 111(3), 877-892. 2006.
- JANG, S. I., LILLEHOJ, H. S., LEE, S. H., LEE, K. W., LILLEHOJ, E. P., HONG, Y. H. & CHUN, J. E. Relative disease susceptibility and clostridial toxin antibody responses in three commercial broiler lines coinfecting with *Clostridium perfringens* and *Eimeria maxima* using an experimental model of necrotic enteritis. **Avian Diseases**, 57(3), 684-687, 2013.
- JIMÉNEZ, S. C., VAESSEN, S. F., SCHREIER, L. L. & MISKA, K. B. The effects of tributyrin supplementation on weight gain and intestinal gene expression in broiler chickens during *Eimeria maxima*-induced coccidiosis. **Poultry Science**, 100(4), 100984. 2021.
- JOHNSON, J.; REID, W. M.. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. **Experimental parasitology**, v. 28, n. 1, p. 30-36, 1970.
- KAMELY, M., TORSHIZI, M. A. K., & RAHIMI, S. Blood biochemistry, thyroid hormones, and performance in broilers with ascites caused by caffeine. **Poultry Science**, 95(11), 2673-2678. 2016.
- KAWAZOE, U.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. 1ed. Facta editora. 2000.
- KOVÁCS, E. G., ALATSHAN, A., BUDAI, M. M., CZIMMERER, Z., BÍRÓ, E., & BENKŐ, S. Caffeine has different immunomodulatory effect on the cytokine expression and NLRP3 inflammasome function in various human macrophage subpopulations. **Nutrients**, 13(7), 2409. 2021.

LEE, Y., LU, M., & LILLEHOJ, H. S. Coccidiosis: Recent progress in host immunity and alternatives to antibiotic strategies. **Vaccines**, 10(2), 215. 2022.

LOWENTHAL, J. W., YORK, J. J., O'NEIL, T. E., RHODES, S., PROWSE, S. J., STROM, A. D. G., & DIGBY, M. R. In vivo effects of chicken interferon- γ during infection with *Eimeria*. **Journal of interferon & cytokine research**, 17(9), 551-558. 1997.

NABIAN, S., F. ARABKHAZAEI, P. SEIFOURI AND A. FARAHANI. Morphometric analysis of the intestine in experimental coccidiosis in broiler treated with anticoccidial drugs. **Ira J. Parasitol.** 13:493-499. 2018.

OÑATIBIA-ASTIBIA, A., MARTÍNEZ-PINILLA, E., & FRANCO, R. The potential of methylxanthine-based therapies in pediatric respiratory tract diseases. **Respiratory medicine**, 112, 1-9. 2016.

OÑATIBIA-ASTIBIA, A., FRANCO, R., & MARTÍNEZ-PINILLA, E. Health benefits of methylxanthines in neurodegenerative diseases. **Molecular nutrition & food research**, 61(6), 1600670. 2017.

PAGLIARI, S., CELANO, R., RASTRELLI, L., SACCO, E., ARLATI, F., LABRA, M., & CAMPONE, L. Extraction of methylxanthines by pressurized hot water extraction from cocoa shell by-product as natural source of functional ingredient. **LWT**, 170, 114115. 2022.

PENDLETON, M., BROWN, S., THOMAS, C. M., & ODLE, B. Potential toxicity of caffeine when used as a dietary supplement for weight loss. **Journal of Dietary Supplements**, 10(1), 1-5. 2013.

PENHA, G. D. A., SUZUKI, E. Y., UEDA, F., BOCARDO, M., & PEREIRA, R. (2008). Coccidiose aviária. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano VI, (11).

REIS, J.; NOBREGA, P. **Tratado de doenças das aves**. Ed. Inst. Biológico, Sao Paulo, 1936.

ROSE, M. E. (1967). Immunity to *Eimeria brunetti* and *Eimeria maxima* infections in the fowl. **Parasitology**, 57(2), 363-370.

ROSE, M. E., HESKETH, P., & WAKELIN, D. (1992). Immune control of murine coccidiosis: CD4+ and CD8+ T lymphocytes contribute differentially in resistance to primary and secondary infections. **Parasitology**, 105(3), 349-354.

SAWYNOK, J. Methylxanthines and pain. **Methylxanthines. Handbook of Experimental Pharmacology**, vol 200. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 311-329, 2011.

TIAN, L., LI, W., HUANG, X., TIAN, D., LIU, J., YANG, X. & SONG, X. Protective efficacy of coccidial common antigen glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

(GAPDH) against challenge with three Eimeria species. **Frontiers in Microbiology**, 8, 1245. 2017.

VAN FURTH, A. M., SEIJMONSBERGEN, E. M., LANGERMANS, J. A., VAN DER MEIDE, P. H., & VAN FURTH, R. Effect of xanthine derivatives and dexamethasone on Streptococcus pneumoniae-stimulated production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta (IL-1 beta), and IL-10 by human leukocytes. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, 2(6), 689-692. 1995.

VIEIRA, A. J., GASPAR, E. M., & SANTOS, P. M. Mechanisms of potential antioxidant activity of caffeine. **Radiation Physics and Chemistry**, 174, 108968. 2020.

WILLIAMS, R. B. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. **Avian pathology**, 34(3), 159-180. 2005.