



ROZA et al., 2017
JCBS, v. 2, n.3, p. 118-122, 2017
ISSN: 2446-9661

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE INFILTRADO INFLAMATÓRIO EM *Rhode island white* APÓS PROCESSO DE IMUNIZAÇÃO COM PROTEÍNAS DE *Trypanossoma cruzi*

ROZA, Guilherme Augusto¹; SOARES, Sara Pauliane Santos²; RIBEIRO, Raphaella Paula³; MEIRA, Wendell, Sérgio Ferreira⁴; OLEGÁRIO, Janaína Grazielle Pacheco⁵; MARQUES, Tatiane⁶.

¹Graduação em Enfermagem, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba (MG), e-mail: guilherme.roza@yahoo.com.br

² Graduação em Biomedicina, Faculdade de Talentos Humanos, Uberaba (MG), e-mail: sarapauliane@hotmail.com

³Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, Universidade de Uberaba, Uberaba (MG), e-mail: raphaellaribeiro6@hotmail.com.

⁴Doutor em Parasitologia, Professor Adjunto na Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba (MG), e-mail: wendellmeira@yahoo.com.br

⁵Doutora em Patologia Geral, Professora na Faculdade de Talentos Humanos, Uberaba (MG), e-mail: janainnapacheco@yahoo.com.br

⁶Mestre em Medicina Tropical e Infectologia, área de Concentração em Parasitologia e Imunologia Aplicadas, Professora na Faculdade de Talentos Humanos, Uberaba (MG), e-mail: tathymarques@gmail.com

Data de submissão: 12 de novembro de 2016 Aceito na versão final: 20 de janeiro de 2017.

RESUMO: Introdução: Galinhas da espécie *Rhode island white* são, atualmente, o modelo de escolha para ensaios de imunização e produção de anticorpos policlonais contra diversos antígenos. A partir dos ovos destes animais é possível purificar as gemas e, desta forma, isolar a IgY de interesse. Os estudos realizados até o momento têm focado somente na obtenção dos anticorpos e na natureza dos antígenos inoculados, de modo que pouco se sabe sobre as reações inflamatórias resultantes da imunização. **Objetivo:** Avaliar a presença e identificar as possíveis lesões inflamatórias resultantes da imunização em galinhas. **Materiais e Métodos:** Foram utilizados como antígenos a Proteína Reguladora do Complemento de *Trypanosoma cruzi* (Tc-CRP) e o extrato total de proteínas de *T. cruzi*, inoculados nas galinhas I e II, respectivamente. Como controle negativo foi utilizada uma galinha não imunizada. Ao final do experimento, deu-se a eutanásia dos animais por deslocamento cervical, para coleta de baço, fígado e tecido muscular esquelético, a partir dos quais foi feita a análise histopatológica. **Resultados:** No local dos inóculos, houve formação de nodulações escurecidas, ricas em infiltrado inflamatório entremeado por granulomas. Analisando órgãos linfóides, observou-se aumento da polpa branca do baço e ausência de alterações hepáticas significativas. **Conclusão:** Conclui-se que os ensaios de imunização provocaram alterações significativas na musculatura esquelética e no baço. As galinhas desenvolveram uma reação inflamatória exacerbada, provavelmente devido ao antígeno e ao adjuvante utilizados, o que pôde ser evidenciado na análise tecidual, resultando em piora do bem-estar físico geral destes animais.

PALAVRAS CHAVE: IgY, Imunização, *Rhode island white*, Tc-CRP, *T. cruzi*

HISTOPATHOLOGICAL ANALYSIS OF INFLAMMATORY INFILTRATE ON *Rhode island white* AFTER IMMUNIZATION PROCESS WITH *Trypanosoma cruzi* PROTEINS

ABSTRACT: Introduction: *Rhode island white* chickens are the best animal model for immunization assays and polyclonal antibodies production against multiple antigens. The yolks egg from these animals can be purified thus isolating the IgY of interest. Studies conducted to date have only focused on obtaining antibodies or in the nature of inoculated antigens, so that little is known about the inflammatory reactions resulting from immunization process. **Aim:** this study aimed to evaluate the presence and identify possible inflammatory lesions resulting from chickens immunization. **Material and methods:** For this purpose, were used as antigens the *Trypanosoma cruzi* Complement Regulatory Protein (Tc-CRP) and *T. cruzi* proteins total extract, inoculated in chickens I and II, respectively. As negative control was used a chicken unimmunized. At the end of the experiment, these animals were euthanized by cervical dislocation, to collect the following organs: spleen, liver and skeletal muscle tissue, from which was made histopathological analysis. **Results:** At the site of inoculum, was evidenced darkened nodules, rich in inflammatory infiltrate interspersed by granulomas. Analyzing lymphoid organs, there was increasing proliferation of white pulp and absence of significant liver changes. **Conclusion:** It is concluded that immunization tests led to significant changes in skeletal muscle and spleen. Chickens developed an increased inflammatory reaction, probably due to the antigen and adjuvant used, which could be demonstrated in tissue analysis, resulting in worsening of general physical well-being of these animals.

KEY WORDS: IgY, Immunization, *Rhode island white*, Tc-CRP, *T. cruzi*

Correspondência para/Correspondence to:

ABRAHÃO, D.P.S. Curso de Enfermagem, Faculdade de Talentos Humanos, Avenida Tônico dos Santos, 333. CEP: 38040-000. Uberaba, MG, Brasil. Tel: +055-34-3311-9800. E-mail: dpsiqueira@factus.edu.br

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O modelo experimental galináceo, principalmente galinhas de granja da espécie *Rhode island white*, vêm tendo uma aplicabilidade cada vez maior em pesquisas e estudos terapêuticos que visem, direta ou indiretamente, o bem-estar do ser humano e de outros animais domésticos (KOVACS-NOLAN; MINE, 2012; SPILLNER *et al.*, 2012; GADDE, RATHINAM, LILLEHOJ, 2015). Nas últimas décadas, as galinhas vêm provando ser o modelo experimental ideal para ensaios de imunização por sua maior resistência à reação inflamatória e pela facilidade na obtenção e purificação de anticorpos policlonais (FERREIRA JUNIOR, 2012; KOVACS-NOLAN; MINE, 2012; MEUNIER, CHEMALY; DORY, 2016).

O uso de gema de ovos como fontes de anticorpos (IgY) é uma alternativa que possui diversas vantagens, tais como: não é um método invasivo para o animal, é de baixa estocagem, baixo custo de obtenção, a quantidade de anticorpos encontrados é maior, enquanto a quantidade necessária de antígenos para uma eficiente imunização das aves é menor que para outros animais (GASSMAN *et al.*, 1990; SPILLNER *et al.*, 2012; GADDE, RATHINAM, LILLEHOJ, 2015).

Em 1893, Klemperer descreveu, em seu estudo, que a imunização de uma galinha resulta simplesmente na transferência de anticorpos específicos para a gema do ovo. Essa passagem transovariana da imunoglobulina IgY pode demorar aproximadamente 5 dias para ocorrer, enquanto que a meia vida dela circulante em aves adultas é de mais ou menos 36 a 65 horas (PATTERSON *et al.*, 1962; MOHAMMED, 1998). Assim, ao ser transferida para o ovo, pode ser purificada e utilizada para o fim na qual se destina, como por exemplo, para a confecção de soros antiparasitários para o ser humano e outros animais (KOVACS-NOLAN; MINE, 2012; SPILLNER *et al.*, 2012; GADDE, RATHINAM, LILLEHOJ, 2015).

Embora os estudos iniciais de Klemperer (1893), não tenham tido muita credibilidade, recentemente, a produção de anticorpos monoclonais ou policlonais em modelos experimentais vêm atraindo a atenção de muitos pesquisadores. Os anticorpos ou as imunoglobulinas galináceas são incrivelmente diversificados e específicos na sua capacidade de reconhecer formas estranhas e destruir microrganismos invasores (SPILLNER *et al.*, 2012; GUO *et al.*, 2013). Seu uso em ensaios diagnósticos e terapia, tem provocado um impacto enorme no bem-estar de humanos e animais e, também, na melhoria da saúde de forma geral (MIAN; BRADWELL; OLSON, 1991; KOVACS-NOLAN; MINE, 2012;).

Para estes ensaios de produção de anticorpos, muitos modelos foram testados, sendo que galinhas de granja se mostraram o mais eficiente deles até o momento (SPILLNER *et al.*, 2012). Os antígenos utilizados nos ensaios de imunização são os mais variados, constituindo-se, na maioria das vezes, de parasitos e bactérias mortos e/ou atenuados. Nos últimos anos, observa-se uma certa tendência para o uso de antígenos proteicos como epítomos

indutores destes anticorpos (FERREIRA JUNIOR, 2012; MEUNIER, CHEMALY; DORY, 2016).

Seguindo esta linha crescente de pesquisa, este trabalho escolheu como antígeno-alvo uma proteína de *Trypanosoma cruzi*, denominada Proteína Reguladora do Complemento de *Trypanosoma cruzi* (Tc-CRP), a qual é expressa somente nas formas tripomastigotas do parasito (MARTIN *et al.*, 1985; NORRIS *et al.*, 1989; 1991). Esta proteína é importante como mecanismo de evasão da resposta imune, pois se liga às proteínas do sistema complemento, evitando a formação do Complexo de Ataque a Membrana (MAC) (KRETTLI, 1978; 1982; 1983). Além disso, a Tc-CRP vem sendo estudada também para verificação de sua capacidade indutora de anticorpos líticos (MEIRA *et al.*, 2002; 2004; MARQUES, 2011).

Os projetos desenvolvidos até o momento tem avaliado esta proteína como marcadora de infecção ativa para doença de Chagas em testes sorológicos, como por exemplo, o ensaio de ELISA. Através destes trabalhos, observou-se que a Tc-CRP apresenta excelente potencial como marcador sorológico para avaliação de resposta imune em portadores da infecção pelo *T. cruzi* (MEIRA *et al.*, 2002; 2004; MARQUES, 2011).

Paralelamente, tem sido considerada a capacidade imunógena desta proteína para a confecção de vacinas, desta forma, foi desenvolvido um estudo em que galinhas foram imunizadas com uma forma recombinante da Tc-CRP e os anticorpos policlonais obtidos foram comparados àqueles resultantes da imunização com extrato total de proteínas de formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Até o presente momento, não foram avaliadas as lesões nos modelos experimentais utilizados. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a presença e identificar as possíveis lesões inflamatórias resultantes do processo de imunização em galinhas.

MÉTODOS

Local de realização do estudo: os modelos experimentais foram mantidos em recintos próprios, reservados para a Pós-graduação em Reprodução e Saúde Animal, localizada no Hospital Veterinário de Uberaba, onde foram realizados os experimentos com estes animais, e os ensaios de imunização. A obtenção dos inóculos e as análises histopatológicas foram realizadas nos laboratórios da Disciplina de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas e Naturais da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

Modelos experimentais: O modelo experimental utilizado neste estudo foi a galinha poedeira (galinhas de granja) de coloração branca, da espécie *Rhode island white*, com aproximadamente dois meses de vida. Para a realização do experimento, foram utilizadas três galinhas, as quais foram devidamente acondicionadas em gaiolas próprias, onde receberam como alimento ração para postura e água *ad libitum*. Uma galinha, o controle negativo, não foi imunizada e sofreu somente o stress de manipulação da coleta de sangue ao longo de todo o período de realização do estudo. Outras duas galinhas, identificadas como I e II, foram imunizadas conforme descrito abaixo.

Ensaio de imunização: As galinhas identificadas como I e II foram imunizadas, respectivamente, com Tc-CRP [purificada a partir de células de ovário de hamster recombinantes, conforme MEIRA *et al.* (2004)] e extrato total de proteínas da forma tripomastigota de *T. cruzi* purificadas conforme CAETANO-SILVA (2010). Ao longo do período de realização deste estudo, foram realizados quatro ensaios de imunização, com intervalo de quinze dias entre eles, utilizando como veículo o Adjuvante Completo de Freund, junto aos inóculos proteicos, para melhor indução da resposta imune. O inóculo dos antígenos (proteínas + adjuvante de Freund) foi aplicado na musculatura esquelética do peito das galinhas. Cerca de um mês após a última imunização, as galinhas receberam um novo inóculo para acelerar o processo inflamatório e, conseqüentemente, aumentar a quantidade de IgY específica para o antígeno liberada nos ovos.

Ao final dos ensaios de imunização e coleta dos ovos necessários, as galinhas foram eutanasiadas por deslocamento cervical no Laboratório de Patologia Clínica da Pós-graduação em Reprodução e Saúde Animal, do Curso de Medicina Veterinária da UNIUBE. Neste procedimento foram coletados, de cada uma das galinhas, o baço, fígado e musculatura esquelética da região do peito, onde foram feitos os inóculos. Este material foi armazenado em formol a 10%, à temperatura ambiente, até o momento da análise.

Análise Histopatológica: Os órgãos coletados foram armazenados em formol por trinta dias e então preparados, de forma que evidenciasse as alterações necessárias. A confecção das lâminas e coloração por hematoxilina-eosina deu-se conforme protocolo previamente padronizado e utilizado rotineiramente no Laboratório de Histologia da Disciplina de Parasitologia (ICBN/UFTM), como se segue. Após fixação do tecido em formol, este foi desidratado em álcool absoluto, diafanizado em xilol para posterior impregnação em parafina. O corte das lâminas foi realizado em micrótomo, com navalha de diamante, e os tecidos cortados foram fixados em lâmina para microscopia e corados por hematoxilina-eosina. Foram confeccionadas três lâminas para cada órgão coletado.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico, nas objetivas de 5x e 10x, onde foram verificadas a presença ou ausência de alterações no parênquima do órgão. Os cortes histológicos da musculatura do peito da galinha, onde foram feitos os inóculos proteicos, foram analisados também com objetiva de 20x, para melhor evidenciar o infiltrado inflamatório e a presença de granulomas típicos. As imagens referentes às alterações observadas foram capturadas utilizando uma câmera especial e o *software* MicroZOOMCap®.

Este Trabalho foi submetido à avaliação e aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFTM sob protocolo número 298/2015.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Galinhas poedeiras da espécie *Rhode island white* foram imunizadas com a forma recombinante da Tc-CRP (MEIRA *et al.*, 2002; 2004; MARQUES, 2011) ou com

extrato total de *T. cruzi*. Os animais foram acompanhados diariamente para coleta dos ovos e monitoramento dos sinais vitais.

Os ensaios de imunização foram realizados ao longo dos meses de março a julho e, em agosto, foi realizado o *booster*, ou seja, o reforço da imunização, para potencializar a produção e, conseqüentemente, a recuperação de IgY policlonal nos ovos destas galinhas.

A galinha controle, correspondente àquela que não foi imunizada, não apresentou sinais visíveis do desenvolvimento de processos patológicos. À eutanásia, o animal apresentava-se levemente anêmico, o que pôde ser constatado pela coloração pálida da crista. Durante a realização da necropsia, evidenciou-se um depósito de tecido adiposo próximo à musculatura do peito, provavelmente resultante do processo de reclusão a que o animal foi submetido.

As galinhas I e II mostraram-se visivelmente abatidas ao exame físico, no qual foi evidenciado certo grau de emagrecimento, devido ao processo inflamatório resultante dos ensaios de imunização, o qual sabidamente pode debilitar o estado de saúde geral do animal. Além disso, observou-se falha recorrente na postura dos ovos na primeira quinzena após o inóculo das proteínas, a qual também pode ser correlacionada ao processo inflamatório. À palpação, a musculatura do peito mostrava-se enrijecida, com a formação de pequenos nódulos escurecidos (visíveis a olho nu), onde foram feitas as injeções de antígeno. Alguns destes nódulos foram coletados durante a necropsia para posterior análise histopatológica, onde observou-se a formação de granulomas em meio ao infiltrado inflamatório (Imagem 2C).

De acordo com Brandão (2008), o processo de imunização é um procedimento de extrema importância, seja em animais, seja em seres humanos. Este processo apresenta benefícios, ao proteger o indivíduo e estimular seu sistema imune, mas também pode apresentar riscos, caracterizados como reações adversas (GADDE, RATHINAM, LILLEHOJ, 2015). Talvez a reação pós-vacinal mais grave seja a reação de hipersensibilidade tipo I, ou seja, aquela resposta imediata, com duração de poucos minutos a horas após a vacinação. Em gatos, por exemplo, os sintomas respiratórios tendem a ser mais graves do que em cães (TIZARD, 2004; GREENE; SCHULTZ, 2006).

As reações de hipersensibilidade tipo IV, caracterizadas por uma resposta tardia, podem se manifestar em gatos com formação de granulomas no local da aplicação da vacina, semelhantes àqueles observados na galinha I. Reações pós-vacinais locais, tais como irritação, dor ou edema no local da aplicação, são relativamente comuns, mas não são consideradas reações de hipersensibilidade verdadeiras. Algumas destas reações podem ser provocadas pelos próprios componentes presentes nas vacinas, como por exemplo o adjuvante de Freund (TIZARD, 2004; GREENE; SCHULTZ, 2006). Reações pós-vacinais locais geralmente têm resolução espontânea ou requerem mínima intervenção. Entretanto, casos de edema ou nodulação persistente podem requerer investigação diagnóstica (GADDE, RATHINAM, LILLEHOJ, 2015).

Imagem 1 – Análises histopatológicas realizadas na galinha do grupo controle (A, C, E) e na galinha I (B, D, F). (A): Corte de baço da galinha controle, aumento de 5x, onde estão bem delimitadas a Polpa Branca e a Polpa Vermelha. (B): Corte de baço da galinha I, aumento 5x, onde observa-se a Polpa Branca com proliferação celular intensa, sugerindo a formação de um centro germinativo, e a Polpa Vermelha. (C): Corte de fígado da galinha controle, aumento 5x, onde podem ser observados hepatócitos com esteatose em torno do espaço porta. (D): Corte de fígados da galinha I, aumento 5x, onde evidencia-se o espaço porta com células normais, sem hemácias ou infiltrado inflamatório. (E): Corte de músculo esquelético da galinha controle, aumento 5x, onde podem ser observadas fibras musculares longitudinais e transversais normais. (F): Corte de músculo esquelético da galinha I, aumento 5x, onde podem ser observados o infiltrado inflamatório, a deposição de tecido colágeno e alguns granulomas (seta).

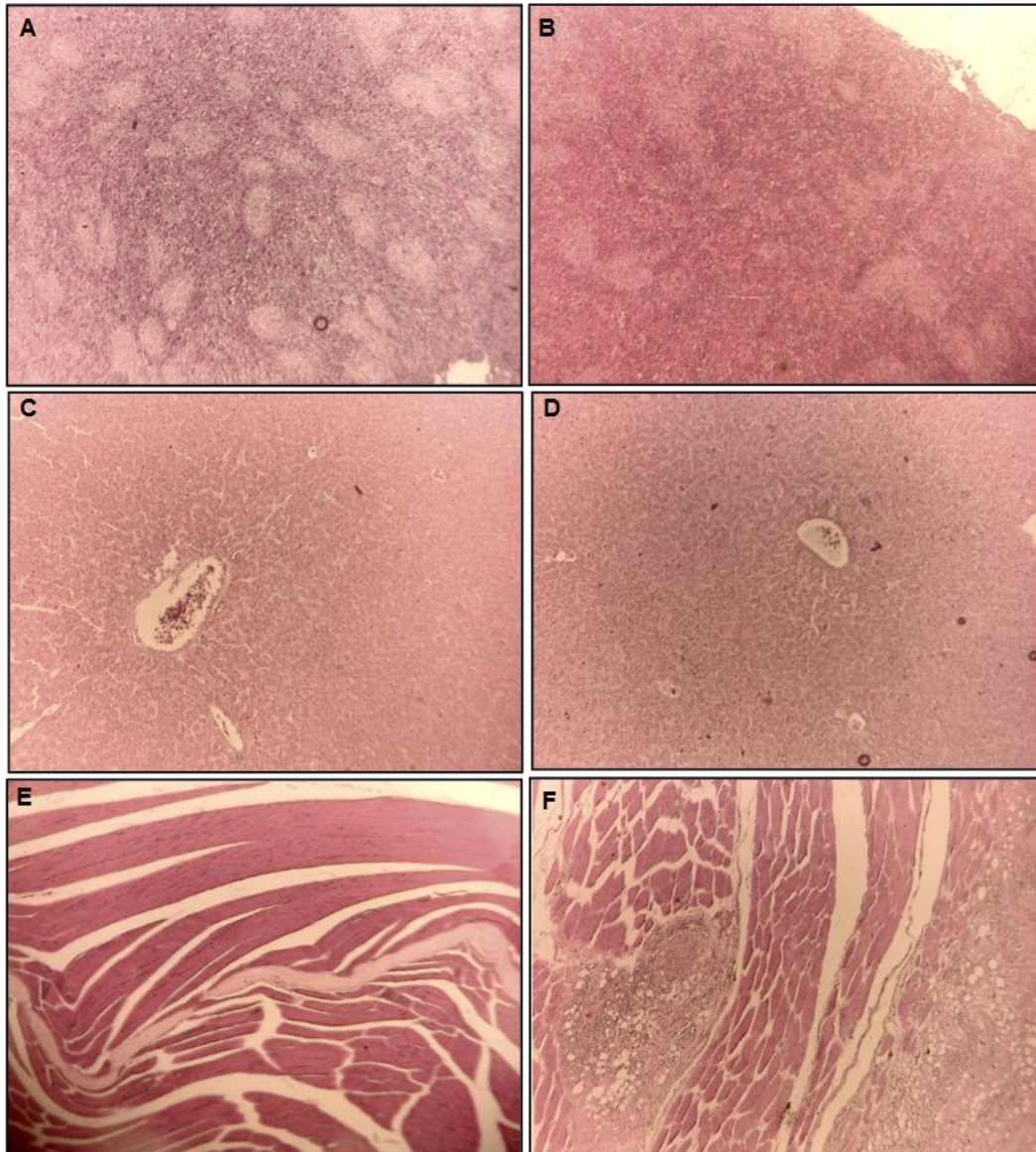
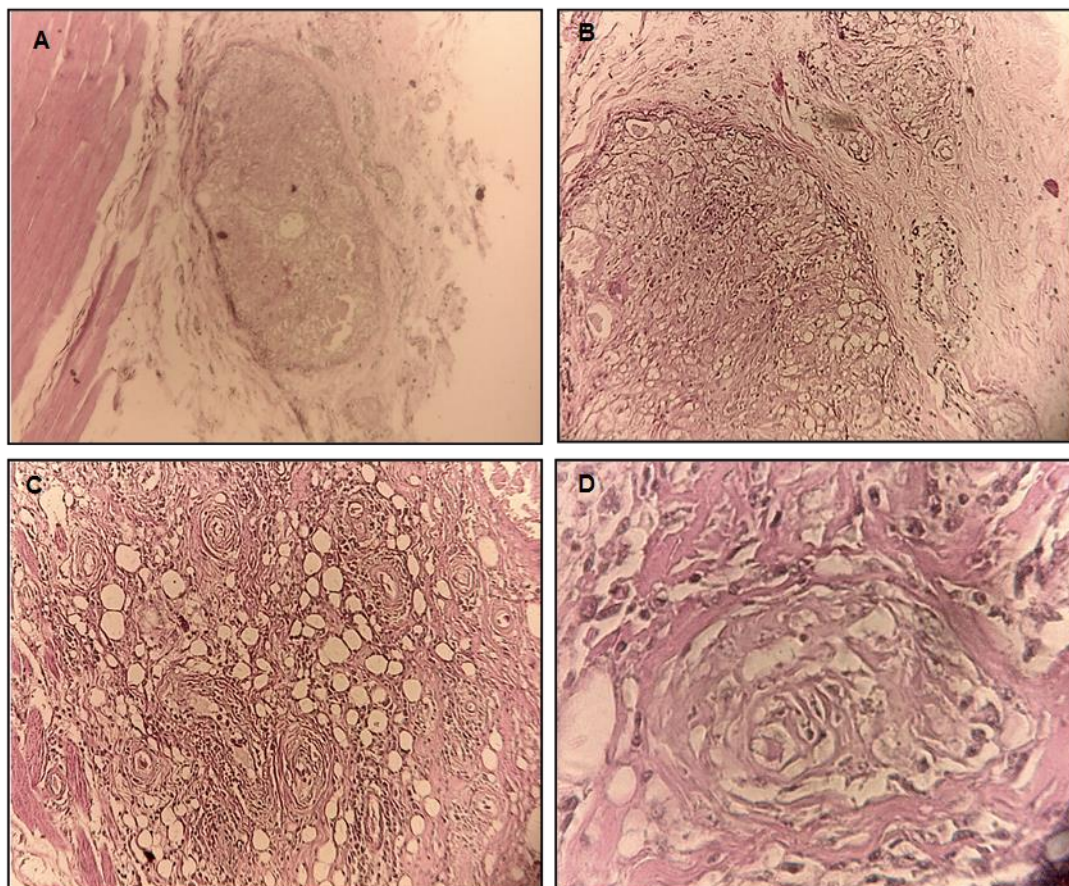


Imagem 2 –Análises histopatológicas realizadas na musculatura esquelética das galinhas I (A, C e D) e II (B), onde é detalhado o infiltrado inflamatório em aumentos crescentes. (A): Corte de músculo esquelético, aumento 5x, com infiltrado inflamatório bem evidenciado, com fibras normais a esquerda. Linfócitos marginais aos vasos sanguíneos representam a diapedese para formação do processo inflamatório. (B): Corte de musculatura esquelética da galinha II, aumento 10x, onde destaca-se a presença de infiltrado inflamatório intenso entremeando as fibras musculares. Observa-se que as células linfóides não chegaram a formar um granuloma. (C): Músculo esquelético da galinha I, aumento 10x, onde fica evidente a propagação do infiltrado inflamatório entremeando as fibras saudáveis, com deposição do tecido colágeno, agrupamentos de células linfóides (linfócitos T/B) e a formação de granulomas bem delimitados. (D): Corte de músculo esquelético da galinha I, aumento 20x, onde destaca-se uma estrutura do granuloma, a célula gigante, envolta por linfócitos e tecido colágeno.



O ensaio de imunização realizado nas galinhas deste estudo utilizou o adjuvante de Freund para potencializar a reação inflamatória e, conseqüentemente, aumentar a quantidade de IgY secretada no ovo. O uso de adjuvantes em ensaios biológicos requer cautela e cuidadosa consideração durante o desenho experimental do projeto. O adjuvante completo de Freund é composto por uma emulsão oleosa em água contendo micobactérias mortas pela ação do calor ou componentes de sua parede celular e é efetivo em potencializar resposta imune humoral e celular contra imunógenos coadministrados (CHAPEL; AUGUST, 1976; CLEMONS *et al*, 1992; JACKSON; FOX, 1995; HAROLD, 2005).

A análise histopatológica revelou um processo de congestão acompanhado de um acúmulo de gordura no tecido hepático, evidenciando esteatose (Imagem 1C) na

galinha do grupo controle. Supõe-se que este possa ter sido gerado pela alimentação e elevadas doses hormonais a que este animal foi submetido durante a fase de crescimento, ainda na granja (*pers. comm.*). Ambas as galinhas, I e II, não desenvolveram nenhuma alteração histopatológica no fígado, como pode ser visualizado na (Imagem 1D) em que se observam hepatócitos normais em torno do espaço porta, no qual estão bem delimitados a veia porta, a artéria hepática e o ducto biliar.

Por outro lado, o baço da galinha controle apresentou-se histologicamente normal, com polpa branca e polpa vermelha bem diferenciadas (Imagem 1A). Alterações consideráveis foram visualizadas nos cortes histológicos do baço das galinhas I e II, onde é notório o aumento da proliferação de células da polpa branca, resultante do intenso infiltrado inflamatório neste órgão. Na galinha II este processo foi bem mais intenso do que na galinha I,

sendo possível inclusive sugerir o desenvolvimento de centros germinativos (Imagem 1B).

Assim como observado nos mamíferos, em galináceos os órgãos linfoides também são classificados em primários e secundários. Os órgãos linfoides primários de galinhas são o Timo e a Bursa de Fabricius, os quais regridem quando o animal atinge a idade adulta (WU; KAISER, 2011; GUO *et al.*, 2013; INGRAO *et al.*, 2013). Sendo os modelos experimentais deste estudo, animais adultos, não foi possível coletar estes órgãos e pesquisar a presença ou ausência de alterações nos mesmos. Entretanto, foram coletados o baço e o fígado, ambos órgãos linfoides secundários, para pesquisa de alterações qualitativas e quantitativas das células inflamatórias.

O baço é o principal local de resposta imune a antígenos provenientes do sangue, os quais são concentrados na Polpa Branca, uma região rica em linfócitos T e B. A função da Polpa Branca é promover respostas imune adquirida aos antígenos transportados pelo sangue (WU; KAISER, 2011; GUO *et al.*, 2013; INGRAO *et al.*, 2013). Assim sendo, parte dos antígenos inoculados durante o processo de imunização das galinhas pode ter sido capturado por células apresentadoras de antígenos e transportado até o baço, justificando o aumento da Polpa Branca, conforme evidenciado pela análise histopatológica.

O fígado também participa da resposta imune principalmente através da fagocitose pelas células de Kupffer, e, pela produção da Proteína C Reativa (PCR). Os hepatócitos e os monócitos são as únicas células capazes de produzir todos os elementos do sistema complemento (WU; KAISER, 2011; GUO *et al.*, 2013; INGRAO *et al.*, 2013), auxiliando, indiretamente, o desenvolvimento do infiltrado inflamatório observado.

As imagens 1E e 2A permitem a visualização de fibras musculares com disposições longitudinais e transversais, ambas sem infiltrado inflamatório e sem maiores alterações morfológicas, sendo representativas da galinha controle. Diferenças marcantes foram observadas em relação ao processo inflamatório e formação de granulomas no tecido muscular esquelético das galinhas I e II. Nas imagens 1F e 2B, é notável a presença de tecido colágeno e de infiltrado inflamatório, entremeando as fibras musculares. Em alguns casos, foi possível inclusive visualizar células linfoides próximas aos vasos sanguíneos e sua distribuição homogênea em toda a área inflamada.

Comparando as galinhas I e II, componentes do grupo experimental, também foi possível estabelecer diferenças entre as lesões observadas. A galinha I, imunizada com a proteína Tc-CRP, apresentou áreas com maior extensão de infiltrado inflamatório, sendo este rico em células linfoides. Nesta galinha, conforme ilustrado na imagem 2C é possível individualizar a formação de diversos granulomas. Analisando o corte histológico em maior aumento (Imagem 2D), destaca-se a presença de célula gigante contendo o material fagocitado (Tc-CRP e adjuvante de Freund), circundados por células linfoides, em meio ao tecido colágeno. Curiosamente, a formação de granulomas bem delimitados não foi observada nas fibras musculares da galinha II (Imagem 2B). Neste animal, são

observadas várias áreas com infiltrado de células linfoides, mas estes não circundavam células gigantes.

O processo de imunização gera uma reação inflamatória intensa, como pôde ser evidenciado neste estudo, no infiltrado inflamatório e nos granulomas presentes na musculatura esquelética, assim como nas formações sugestivas da presença de centro germinativo no baço. A intensa resposta inflamatória peri-vascular observada neste estudo também foi relatada em outros trabalhos (FINN & NIELSEN, 1971; NASH *et al.*, 1986; MATUSHIMA, 1994), e reforça a teoria de que houve a migração de macrófagos em direção ao local do inóculo.

A formação dos granulomas no local da imunização é uma consequência da resposta inflamatória que segue um padrão de desenvolvimento celular (WU; KAISER, 2011). Inicialmente, há a proliferação de macrófagos, que tentam fagocitar o agente infeccioso que, no caso deste estudo, é o antígeno proteico. Para a formação dos granulomas, estas células podem ainda se fundir, originando as células gigantes multinucleadas observadas na análise histopatológica da galinha I, ocupando a porção central do granuloma. Na periferia, estão presentes linfócitos T, os quais caracterizam uma resposta de hipersensibilidade tardia, e modulam a resposta dos macrófagos. Na região periférica proliferam fibroblastos e vasos sanguíneos, como observado na Imagem 2B. A inflamação granulomatosa é uma forma de hipersensibilidade tardia crônica, muitas vezes em resposta a micróbios persistentes ou em resposta a antígenos particulados que não são prontamente fagocitados (GUO *et al.*, 2013; INGRAO *et al.*, 2013), como por exemplo, antígenos proteicos inoculados em ensaios de imunização.

Infelizmente os dados coletados neste trabalho não permitem esclarecer, ao certo, a causa da não-formação do granuloma no tecido analisado da galinha II. Entretanto, é provável que seja devido à diferença nos antígenos inoculados, uma vez que a Tc-CRP é uma proteína bastante imunógena. No *T. cruzi*, a Tc-CRP é expressa exclusivamente nas formas tripomastigotas e se liga a proteínas do Sistema Complemento, com a finalidade de evitar a formação da enzima C₃-convertase, permitindo a perpetuação da infecção (KRETTLI, 1978; 1982; 1983). Dessa forma, embora não seja possível comprovar, pode-se inferir que a presença desta proteína em grande quantidade no inóculo tenha contribuído para a formação dos granulomas observados na galinha I.

Entretanto, o presente trabalho apresenta um diferencial em relação a outros descritos na literatura, devido ao tipo de inóculo realizado nestas galinhas. Na maioria das vezes, os processos de imunização utilizam o parasito inteiro e não apenas o antígeno propriamente dito, como por exemplo, a proteína Tc-CRP. Ao imunizar as galinhas com as proteínas purificadas, inocula-se o antígeno já processado, facilitando o desenvolvimento da resposta imune. Além disso, são raros os relatos de estudos avaliando a histopatologia de galináceos após ensaios de imunização, pois estes são modelos experimentais comuns somente para a produção de anticorpos policlonais, e não para avaliação do processo inflamatório. Dentre os modelos mais avaliados, o murino é o que se sobressai em relação ao

processo inflamatório, como por exemplo, no estudo de Lins *et al* (2008), no qual há uma discussão sobre a distribuição de eosinófilos nas diferentes fases de evolução de granuloma hepático em camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*.

Por fim, ao observar que o processo de imunização em galinhas ou até mesmo em outros animais provoca alterações bastante consideráveis, é importante direcionar os estudos para os efeitos adversos da imunização em seres humanos.

CONCLUSÃO

Os ensaios de imunização nos galináceos estudados provocaram alterações histopatológicas significativas na musculatura esquelética e no baço, sendo diferenciados conforme o antígeno utilizado. As galinhas desenvolveram uma reação inflamatória exacerbada, devido ao adjuvante utilizado e, provavelmente devido ao antígeno escolhido, que pôde ser evidenciada na análise tecidual e, previamente, observada no comportamento dos animais e na perda de qualidade de vida e piora do bem-estar físico geral do animal

REFERÊNCIAS

- BRANDÃO, L. Reações Adversas Pós-vacinais em Felinos. In: Feline Adverse Reactions, *Compendium on Continuing Education for Veterinarians* v. 30, n. 3, 164-165, 2008.
- CAETANO-SILVA, G. Análises bioquímicas e moleculares dos perfis antigênicos de isolados de *Trypanosoma cruzi*-like obtidos de morcegos capturados na região do Triângulo Mineiro: uma comparação com *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*. **Dissertação de Mestrado**. 150p. Uberaba, 2010.
- CHAPEL, H. M., AND AUGUST, P. J. Report of Nine Cases of Accidental Injury to Man with Freund's Complete Adjuvant. **Clin. Exp. Immunol.** v. 24, p. 538-541, 1976.
- CLEMONS, D. J., C. BESCH-WILLIFORD, E. K. STEFFEN, L. K. RILEY, AND D. H. MOORE. Evaluation of Subcutaneously Implanted Chamber for Antibody Production in Rabbits. **Lab. Anim. Sci.** v.42, p. 307-311, 1992.
- FERREIRA JÚNIOR A, SANTIAGO FM, SILVA MV, FERREIRA FB, MACEDO JUNIOR AG, *et al.* (2012) Production, Characterization and Applications for *Toxoplasma gondii*-Specific Polyclonal Chicken Egg Yolk Immunoglobulins. **Journal PLoS ONE**. 7ed.
- FINN, J. P. AND NIELSEN, N. O. The inflammatory response of rainbow trout. **Journal of Fish Biology.** v. 3, p. 463-478, 1971.
- GADDE, U.; RATHINAM, T.; LILLEHOJ, H. S. Passive immunization with hyperimmune egg-yolk IgY as prophylaxis and therapy for poultry diseases. A review. **Anim. Health Res. Rev.** v. 16 (2), p. 163-176, 2015.
- GASSMANN M. et al. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. **The FASEB Journal**. Zurich, V.4 p. 2528-2532, 1990.
- GASSMANN M. *et al.* Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. **The FASEB Journal**. Zurich, V.4 p. 2528-2532, 1990.
- GREENE, C.E.; SCHULTZ, R.D. Immunoprophylaxis. In: Infectious Diseases of the Dog and the Cat. **St. Louis, Saunders-Elsevier**, Canada, 3 ed. p.1069-1119, 2006.
- GUO, P.; THOMAS, J. D.; BRUCE, M. P.; HINTON, T. M.; BEAN, A. G.; LOWENTHAL, J. W. the chicken Th1 response: potential therapeutic applications of ChIFN- γ . **Dev. Comp. Immunol.** v. 41 (3), p. 389-396, 2013.
- HAROLD F STILLS, JR. Adjuvants and Antibody Production: Dispelling the myths associated with Freund's Complete and Other Adjuvants. **ILAR journal** v. 46, p. 280-293, 2005.
- INGRAO, F.; RAUW, F.; LAMBRECHT, B.; VAN DEN BERG, T. Infectious Bursal Disease: a complex host-pathogen interaction. **Dev. Comp. Immunol.** v. 41 (3), 429-438. 2013
- JACKSON, L.R., AND J.G. FOX. Institutional Policies and Guidelines on Adjuvants and Antibody Production. **ILAR Journal** v.37, p.141-150, 1995.
- KLEMPERER, F. XV. Ueber natürliche Immunität und ihre Verwertung für die Immunisierungstherapie. In: Naunyn, B., Schmiedeberg, O. (Eds.), **Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, Verlag von F.C.W. Vogel, Leipzig, Einunddreissigster Band, 1893.
- KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. **Annu. Rev. Food Sci. Technol.** v. 3, p. 163-182, 2012.
- KRETTLI, A. U. Antibodies to *Trypanosoma cruzi* in experimental and human infections. **African J. Clin. Exp. Immun.** v. 3, p. 327, 1982.
- KRETTLI, A. U. Efeito de anticorpos e do complemento sobre tripomastigotas sanguíneas de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*. **Tese de doutorado**. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 111pp. 1978.
- KRETTLI, A. U. Resposta imune humoral na doença de Chagas. **Interciência**. v. 8, p. 347- 383, 1983.

- LINS, *et al.* A distribuição dos eosinófilos nas diferentes fases de evolução do granuloma hepático em camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V. 41(2), p. 173-178, 2008.
- MARQUES, T. Identificação e comparação de polimorfismos no gene codificador da Proteína Reguladora do Complemento de *Trypanosoma cruzi* (Tc-CRP) e avaliação dos níveis de anticorpos líticos induzidos por esta proteína nos modelos experimentais BALB/c e C57Bl/6. **Dissertação de Mestrado**. 197p. Uberaba, 2011.
- MARTINS, M. S.; HUDSON, L.; KRETTLI, A. U.; CANÇADO, J. R.; BRENER, Z. Human and mouse sera recognise the same polypeptide associated with immunological resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **Clin. Exp. Immunol.** v. 61, p. 343-350, 1985.
- MATUSHIMA, E. R. Avaliação do processo inflamatório crônico granulomatoso induzido experimentalmente através da inoculação de BCG em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* – Tilápia do Nilo. **PhD Thesis**, University of São Paulo, Sao Paulo, Brazil. 120pp, 1994.
- MEIRA, W. S. F.; GALVÃO, L. M. C.; GONTIJO, E. D.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; NORRIS, K. A.; CHIARI, E. *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein: a novel antigen for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Chagas' disease. **J. Clin. Microbiol.** v. 40, p. 3735-3740, 2002.
- MEIRA, W. S. F.; GALVÃO, L. M. C.; GONTIJO, E. D.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; NORRIS, K. A.; CHIARI, E. Use of the *Trypanosoma cruzi* recombinant complement regulatory protein to evaluate therapeutic efficacy following treatment of chronic chagasic patients. **J. Clin. Microbiol.** v. 42, p. 707-712, 2004.
- MEUNIER, M.; CHEMALY, M.; DORY, D. DNA vaccination of poultry: the current status in 2015. **Vaccine**. v. 34 (2), p. 202-211, 2016.
- MIAN I, BRADWELL A, OLSON A. Structure, function and properties of antibody binding sites. **J Mol Biol**. V. 271, p. 133-51, 1991.
- MOHAMMED, S.M., *et al.* Deposition of genetically engineered human antibodies into the egg yolk of hens. **Journal of Immunotechnology**. Rio de Janeiro v. 4,p. 115-125, 1998.
- NASH, K. A.; FLETCHER, T. C. AND THOMSON, A. W. Migration of fish leucocytes in vitro: the effect of factors which may be involved in mediating inflammation. **Journal Veterinary Immunology and Immunopathology**., v.12, p.83-92, 1986.
- NORRIS, K. A.; BRADT, B.; COOPER, N. R.; SO, M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. **J. Immunol.** v. 147, 2240-2247, 1991.
- NORRIS, K. A.; HARTH, G.; SO, M. Purification of a *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein which elicits lytic antibodies. **Infect. Immun.** v. 57, p.2372-2377, 1989.
- PATTERSON, R, YOUNNGER, J.S., WEIGLE, W.O. & DIXON, F.J. Antibody production and transfer to egg yolk in chickens. **Journal of Immunology**. v.89, p. 272-278, 1962.
- SPILLNER, E.; BRAREN, I.; GREUNKE, K.; SEISMANN, H.; BLANK, S. DU PLESSIS, D. Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. **Biologicals**. v. 40 (5), p. 313-322, 2012.
- TIZARD, I.R. The use of vaccines. In: Veterinary Immunology: an introduction, **Philadelphia, Saunders**, USA, 7 ed. p. 260-271, 2004.
- WU, Z.; KAISER, P. Antigen presenting cells in a non-mammalian model system, the chicken. **Immunobiology**. v. 216 (11), p. 1177-1183, 2011.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wendell Sérgio Ferreira Meira, por disponibilizar a infraestrutura dos laboratórios da Disciplina de Parasitologia. Ao Prof. Dr. Álvaro Ferreira Júnior e à Veterinária Raphaella Ribeiro, por disponibilizar a infraestrutura dos laboratórios da Pós-graduação em Reprodução e Saúde Animal e pelo auxílio na manipulação dos animais.