

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ELETROFORETOGRAMA DE PROTEÍNAS DE
PERUS (*Meleagris gallopavo*) VACINADAS
CONTRA DOENÇA DE NEWCASTLE DURANTE O
PERÍODO DE POSTURA**

JONINE RAYANE WOITEXEN BRANCHER

BOTUCATU – SP
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ELETROFORETOGRAMA DE PROTEÍNAS DE
PERUS (*Meleagris gallopavo*) VACINADAS
CONTRA DOENÇA DE NEWCASTLE DURANTE O
PERÍODO DE POSTURA**

JONINE RAYANE WOITEXEN BRANCHER

Dissertação apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^a Dra. Elizabeth M. dos S.
Schmidt

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSANGELA APARECIDA LOBO**

Brancher, Jonine Rayane Woitexen.

Eletroforetograma de proteínas de perus (*meleagris gallopavo*) vacinadas contra doença de Newcastle durante o período de postura / Jonine Rayane Woitexen Brancher. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Elizabeth M. dos S. Schmidt

Capes: 50503030

1. Newcastle, Doença de. 2. Peru (Ave) - Criação. 3. Proteínas – Síntese. 4. Vacinação. 5. Ave – Doenças – Vacinação.

Palavras-chave: Doença de Newcastle; Peru; Proteínas de fase aguda; Vacinação.

"Comece fazendo o que é necessário,
depois o que é possível, e
de repente você estará fazendo o impossível."

São Francisco de Assis

DEDICO

A minha família!

Fonte de amor, recarregadora de energias, meu lugar de colo e consolo.

Aos meus pais, João e Rita;

As pessoas mais importantes da minha vida, que me geraram, me ensinaram valores e que me acompanham e abdicam qualquer coisa para estarem comigo.

Obrigada pelo exemplo, carinho, dedicação e pelo amor incondicional.

Ao meu irmão, Igor;

A pessoa mais carismática, carinhosa e especial que existe e que me ensina a ver a vida com outros olhos.

Obrigada por deixar as estradas da vida mais leve.

Ao meu marido, Fábio;

Uma pessoa centrada, que me ensinou a traçar metas, fazer planos para conquistar nossos sonhos.

Obrigada pelo apoio para começar e para concluir esta jornada, mesmo que isso resultasse em estar a 1000 km de distância.

DEDICO

A minha orientadora Elizabeth,
Mais que orientadora e mestre, é uma amiga.
Poucos têm o privilégio de ter alguém como você de orientadora.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por me dar coragem para percorrer 1000 quilômetros em todas as 20 viagens feitas até Botucatu; por todas as pessoas que ele colocou em meu caminho neste percurso para que pudesse chegar até aqui.

Aos meus pais, **João e Rita** e meu irmão, **Igor**; pelo carinho, companheirismo, pelos lanches das viagens, por cuidarem da Dory, quando estava em viagem.

Ao meu marido, **Fábio**; pelo incentivo e companheirismo, por cuidar da nossa casa e da Dory.

A minha orientadora **Elizabeth**, pela amizade, paciência, auxílio e ensinamentos. Por ceder as amostras para que esta pesquisa se realizasse.

Aos amigos, **Marilda, Carlos Renato, e Érika** que abriram as portas de sua casa sem me conhecer e tornaram os meus dias longe de casa mais amenos e divertidos.

Ao **Instituto Catarinense de Sanidade Agropecuária - ICASA**, empresa que trabalho e que me liberou quando precisei me ausentar.

Ao **Programa de Pós-graduação da FMVZ UNESP - Campus Botucatu**, por oferecer um Mestrado de excelência.

Ao Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV, UNESP, campus de Jaboticabal; nas pessoas do **Prof. Dr. José Jurandir Fagliari e Paulo Césa da Silva**; pelo auxílio na realização das eletroforeses.

Aos Professores, **Dr. Antonio Carlos Paulillo e Adriano Sakai** pela participação na banca de defesa desta dissertação.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alteração da concentração de proteínas de fase aguda.....	6
---	----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proteínas de fase aguda nas diferentes espécies de acordo com a intensidade da alteração durante a resposta de fase aguda.....	5
Tabela 2 - Distribuição dos perus fêmea em diferentes grupos experimentais, vacinados contra DN na 32ª semana e revacinadas na 40ª e 48ª semana de idade, com diferentes estirpes vacinais.....	16
Tabela 3 - Médias geométricas dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI) ($\log_2$) dos soros das fêmeas de perus (<i>Meleagris gallopavo</i>) submetidas a dois programas de vacinação, contra a doença de Newcastle, em período compreendido entre 32 a 52 semanas de idade, nos diferentes grupos (n=45).....	20
Tabela 4 - Concentração das proteínas séricas totais (g/dL) e das frações proteicas (mg/dL) IgA e ceruloplasmina de perus fêmeas em fase de produção, entre 32 e 52 semanas de idade (n=45).....	22
Tabela 5 - Concentração das frações proteicas (mg/dL) transferrina, ovotransferrina e albumina (g/dL) de perus fêmeas em fase de produção, entre 32 e 52 semanas de idade (n=45).....	23
Tabela 6 - Concentração das frações proteicas (mg/dL) IgG de cadeia pesada, Haptoglobina/PIT 54 e Alfa-1 Glicoproteína ácida de perus fêmeas em fase de produção, entre 32 e 52 semanas de idade (n=45).....	24
Tabela 7 - Concentração das frações proteicas (mg/dL) IgG de cadeia leve e PM 23.000 dáltons; de perus fêmeas em fase de produção, entre 32 e 52 semanas de idade (n=45).....	25

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Proteínas de fase aguda (PFAS).....	3
2.1.1 Proteína C Reativa (CRP)	7
2.1.2 Amiloide A sérico (SAA).....	7
2.1.3 Haptoglobina (HP)/PIT 54	8
2.1.4 Ceruloplasmina (CP).....	9
2.1.5 Alfa-1glicoproteína ácida (α 1-AGP).....	10
2.1.6 Transferrina.....	10
2.1.7 Ovotransferrina (OVT).....	11
2.2 Doença de Newcastle	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Manejo das aves.....	14
3.2 Vacinas e Vacinação.....	14
3.2.1 Vacina inativada oleosa.....	15
3.2.1.1 Vacinação via subcutânea.....	15
3.2.2 Vacinas Vivas.....	16
3.2.2.1 Vacinação via ocular.....	16
3.3 Inibição da Hemaglutinação (HI).....	17
3.4 Estudo do perfil eletroforético das proteínas séricas.....	18
3.5 Determinação da ovotransferrina.....	18
3.6 Delineamento experimental.....	19
4. RESULTADOS	20
4.1 Reação inibição da hemaglutinação (HI).....	20
4.2 Eletroforese de proteínas séricas.....	20
5. DISCUSSÃO.....	26
6. CONCLUSÃO.....	30
7. REFERÊNCIA.....	31
8. ARTIGO CIENTÍFICO.....	38

ANEXO.....

54

BRANCHER, J.R.W. ELETROFORETOGRAMA DE PROTEÍNAS DE PERUS (*Meleagris gallopavo*) VACINADAS CONTRA DOENÇA DE NEWCASTLE DURANTE O PERÍODO DE POSTURA. Botucatu, 2013. 50p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O Brasil possui a terceira maior produção mundial de perus, e é o segundo maior exportador desta ave. As proteínas de fase aguda são sintetizadas principalmente nos hepatócitos, porém, também há produção extra-hepática. Isto é causado por citocinas pró inflamatórias, tais como Interleucinas IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), responsáveis pela indução da síntese e secreção dessas proteínas, principalmente pelo fígado, frente uma infecção ou inflamação. O principal propósito desta investigação é demonstrar como as proteínas de fase aguda podem servir de ferramenta para monitorar a eficácia da vacinação contra a doença de Newcastle, utilizando-se as cepas LaSota ativada e inativada em perus fêmeas em fase de produção, ao se comparar com um grupo controle não vacinado. Houve diferença significativa ($p<0,05$) para as concentrações da alfa-1 glicoproteína ácida entre o grupo vacinado com a cepa LaSota inativada e o grupo vacinado com a cepa LaSota ativada, na 36ª semana. Houve diferença significativa ($p<0,05$) para as concentrações de IgG cadeia pesada entre o grupo vacinado com a cepa LaSota inativada e o grupo vacinado com a cepa LaSota ativada, na 38ª semana. Na 46ª semana, as concentrações de proteínas totais apresentaram diferença significativa ($p<0,05$), entre o grupo vacinado com a cepa LaSota inativada e o grupo controle. Na 48ª semana foram observadas diferenças significativas ($p<0,05$) para as concentrações da ovotransferrina, entre o grupo vacinado com a cepa LaSota ativada e o grupo vacinado com a cepa LaSota inativada e as concentrações séricas da IgG de cadeia leve apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) entre o grupo vacinado com a cepa LaSota inativada em relação ao grupo controle. Houve diferença significativa ($p<0,05$) para as concentrações da alfa-1 glicoproteína ácida entre o grupo controle e o grupo vacinado com cepa LaSota inativada, na 52ª semana. A fração de ovotransferrina, de 80kD, foi identificada em todas as aves avaliadas.

BRANCHER, J.R.W. ELECTROPHORETOGRAM OF PROTEINS IN EGG-LAYING TURKEYS (*Meleagris gallopavo*) VACCINATED AGAINST NEWCASTLE DISEASE. Botucatu, 2013. 50p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Brazil has the third largest worldwide production of turkeys, and is the second largest exporter of this bird. The acute phase proteins are synthesized mainly in hepatocytes, but there is also an extrahepatic production. This is promoted by inflammatory cytokines, such as interleukins IL-1, IL-6 and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), responsible for the induction of synthesis and secretion of these protein in response to an infection or inflammation. The purpose of this study is to demonstrate how the acute phase proteins could be used as tools to monitor the effectiveness of vaccination against Newcastle disease, using the LaSota activated and inactivated strains in female egg-laying turkeys when compared with a non-vaccinated control group. Significant differences ($p < 0.05$) were found for the concentrations of alpha-1-acid glycoprotein between the group vaccinated with the LaSota inactivated strain and the group vaccinated with LaSota activated strain at 36 weeks. Significant differences ($p < 0.05$) were found for the concentrations of IgG heavy chain from the group vaccinated with the LaSota inactivated strain and the group vaccinated with the LaSota activated strain at 38 weeks. In the 46th week, the total protein concentrations showed significant differences ($p < 0.05$) between the group vaccinated with the LaSota inactivated strain and the control group. On week 48 significant differences ($p < 0.05$) were found for the concentrations of ovotransferrin, between vaccinated birds with LaSota activated strain and the group vaccinated with the LaSota inactivated strain, and serum concentrations of IgG light chain showed a significant difference ($p < 0.05$) between the group vaccinated with the LaSota inactivated strain in the control group. Significant differences ($p < 0.05$) were found for the concentrations of alpha-1-acid glycoprotein between the control group and the group vaccinated with LaSota inactivated strain in week 52. The ovotransferrin showed a molecular weight of 80kD for all the birds evaluated.

1. INTRODUÇÃO

O peru (*Meleagris gallopavo*, Linnaeus, 1758, Galliformes, *Phasianidae*), é uma ave originária da América do Norte, onde foi domesticada primeiramente por povos mexicanos e, posteriormente, após a descoberta das Américas, levada e domesticada na Europa, onde se tornou popular (BRANT, 1998). No Brasil, as principais raças criadas são: Bronze, Bronze Peito Largo, Holandês Branco, Bourbon Vermelho e o Beltsville Branco.

O Brasil possui a terceira maior produção mundial de perus, e é o segundo maior exportador desta ave. Devido a sua relevância econômica na avicultura o manejo sanitário é de suma importância (BACK, 2007).

Os perus são aves de alta produção comercial, elevado potencial zootécnico e susceptíveis a infecção pelo vírus da doença de Newcastle.

As proteínas são os componentes mais abundantes do plasma, compostas por aminoácidos, sendo que aproximadamente metade destes não é sintetizada e precisam ser obtidos na dieta. Possuem inúmeras funções, desde a formação da estrutura celular e estrutura de organismos, manutenção da pressão osmótica, além de atuarem como catalisadores bioquímicos. No plasma, as principais funções estão relacionadas com a participação na coagulação do sangue, na defesa do organismo (imunoglobulinas), no transporte de metabólitos (transferrina, albumina), regulação de metabolismo (hormônios), entre outras (ECKERSALL, 2008).

As proteínas plasmáticas são sintetizadas principalmente nos hepatócitos, porém, também há produção extra-hepática. Tecidos como intestino, pulmão, adiposo e glândula mamária, são capazes de produzir proteínas como a haptoglobina e o amiloide A sérico frente uma infecção ou inflamação (ECKERSALL e BELL, 2010; ECKERSALL, 2008; GRUYS et al., 2005; MURATA et al., 2004; ECKERSALL, 2000).

A síntese de albumina é estimulada pela diminuição da pressão osmótica, mas pode ser afetada por alterações fisiopatológicas durante uma infecção ou um distúrbio inflamatório quando a sua produção é reduzida. Isto é causado por citocinas pró inflamatórias, tais como Interleucinas IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), responsáveis pela indução da síntese e secreção de

proteínas de fase aguda, principalmente pelo fígado (ECKERSALL, 2008; GRUYS, et al., 2005 MURATA, et al., 2004).

O principal propósito desta investigação é demonstrar como as proteínas de fase aguda podem servir de ferramenta para monitorar a eficácia da vacinação contra a doença de Newcastle, tendo como base a reação de inibição de hemaglutinação, utilizando-se as cepas LaSota ativada e inativada, em perus fêmeas em fase de produção, ao se comparar com um grupo controle não vacinado.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Proteínas de fase aguda (PFAS)

A resposta de fase aguda é um mecanismo inato do organismo que ocorre após uma agressão tecidual, seja infecciosa, traumática, neoplásica ou imunológica e que tem como propósito restaurar a homeostasia e eliminar o agente agressor. É caracterizada por efeitos sistêmicos como febre, leucocitose, alterações metabólicas, diminuição nas concentrações de zinco e ferro e alteração na concentração de proteínas (CERÓN et al., 2005).

O soro sanguíneo possui uma complexa mistura de proteínas, cada uma com uma diferente estrutura e propriedade, sendo que as concentrações destas proteínas são afetadas pelo estado nutricional, estado fisiológico e presença de infecções e inflamações (POLAT et al., 2004).

As proteínas de fase aguda (PFAs) começaram a ser identificadas por volta de 1900 (CRAY, 2012). A primeira proteína a ser reconhecida foi a Proteína C Reativa em 1930 (ECKERSALL, 2000). O termo “fase aguda” foi introduzido em 1941 (PETERSEN et al., 2004), mas a partir de 1990 houve um avanço na área de bioquímica clínica animal demonstrando que as proteínas sanguíneas podem identificar a presença de infecção ou processos inflamatórios. Entretanto, há diferença na concentração destas proteínas entre as diferentes espécies animais (ECKERSALL, 2008).

A primeira linhagem de células de defesa, além de iniciar a resposta de fase aguda, ativa rapidamente os principais mediadores de produção de PFAs pelo fígado, que são conhecidas como citocinas pró- inflamatórias, sendo elas as Interleucinas-1 (IL1) e 6 (IL6) e o Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) (CERÓN et al., 2005).

Algumas proteínas, conhecidas como PFAs negativas, apresentam menores concentrações sanguíneas pela diminuição da produção, nos hepatócitos, em resposta a ação das citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-1. Dentre as principais PFAs negativas estão a albumina e a transferrina em mamíferos (MURATA et al., 2004).

Por outro lado, outras proteínas como a proteína C reativa, amiloide A sérico e haptoglobina apresentam aumento das suas concentrações sanguíneas, sendo conhecidas como PFAs positivas (CERÓN et al., 2005).

As funções das proteínas de fase aguda ainda estão sendo descritas na medicina veterinária. O fibrinogênio, presente no plasma e precursor da fibrina, é utilizado para formação de tampões hemostáticos em lesões vasculares. A Proteína C Reativa promove a ligação do complemento a bactérias e induz a produção de citocinas. O Amiloide A Sérico promove o recrutamento de células inflamatórias para o local de inflamação e a haptoglobina liga-se aos dímeros de hemoglobina deixando o ferro indisponível para microrganismos. A ceruloplasmina transporta o cobre e possui ações anti-oxidativas (STOCKHAM e SCOTT, 2011).

As inflamações e as respostas das PFAs são comuns em todas as espécies, mas possuem sensibilidade variável de acordo com os processos inflamatórios nas diferentes espécies (CRAY, 2012; ECKERSALL, 2000). Em animais de produção, como em vacas com mastite, a análise das PFAs demonstrou alterações nas concentrações da haptoglobina e amiloide A sérico (ECKERSALL et al., 2001). Foram também observadas alterações em bovinos com theileriose nas concentrações de Amiloide A sérico, alfa-1 glicoproteína ácida e mais tardiamente de haptoglobina (GLASS et al., 2003). Em equinos com influenza, houve alteração nas concentrações de Amiloide A sérico (HULTEN et al, 1999). Em suínos, as PFAs têm sido avaliadas em doenças causadas pelo circovírus, doença de Aujeszkey, micoplasma e nos vírus causadores das síndromes respiratórias. Em cães, concentrações elevadas de proteína C reativa foram observadas em casos de piometra, poliartrite, pancreatite e paniculite (CRAY, 2012).

As PFAs são classificadas conforme a intensidade da alteração da sua concentração durante a resposta de fase aguda e esta classificação apresenta diferenças para uma mesma proteína entre as diferentes espécies animais (Tabela 1). A classificação denomina-se *maior*, quando a PFA tem baixa concentração no soro de animais saudáveis e aumenta a sua concentração entre 100 e 1000 vezes, quando estimuladas em um período de 24-48 horas e retrocede rapidamente durante a fase de recuperação. Nas proteínas *moderadas*, a concentração aumenta cinco a 10 vezes, entre 48 a 72 horas, quando

estimuladas e o declínio é mais lento na fase de recuperação. Nas *menores*, a concentração sérica aumenta em 50 a 100% em relação à concentração normal (ECKERSALL e BELL, 2010; ECKERSALL, 2008).

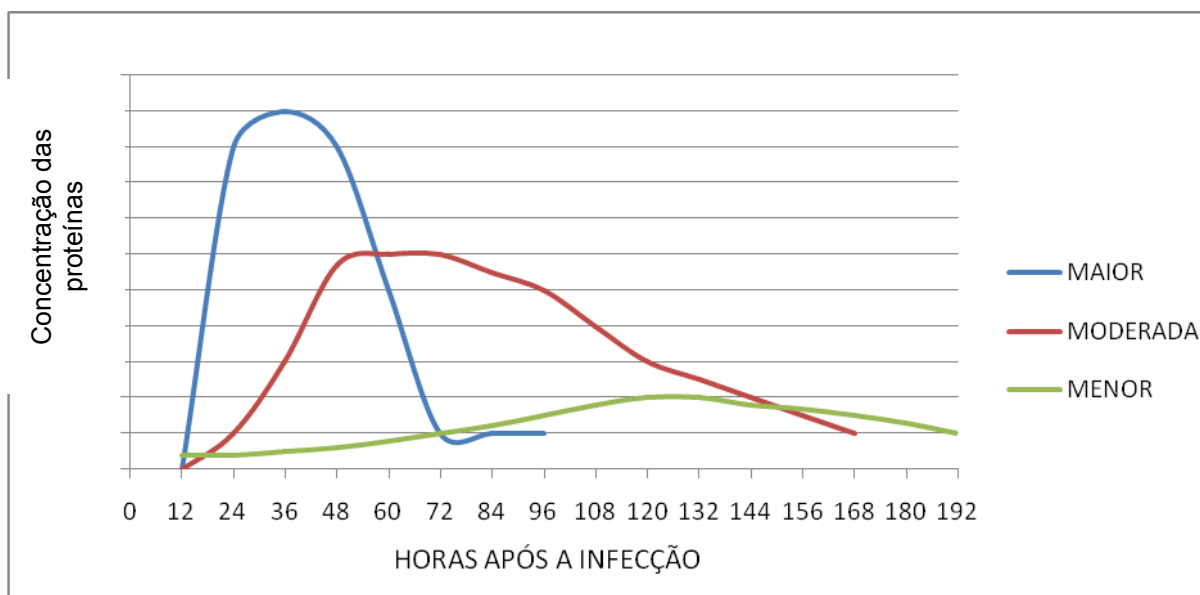
TABELA 1 – Proteínas de fase aguda nas diferentes espécies animais de acordo com a intensidade da alteração durante a resposta de fase aguda

ESPÉCIE	MAIOR	MODERADA E MENOR
BOVINOS	Haptoglobina Amiloide A Sérico	Ceruloplasmina, Alfa-1 Glicoproteína Ácida Proteína C Reativa
SUINOS	Haptoglobina Amiloide A Sérico	Ceruloplasmina, Alfa-1 Glicoproteína Ácida Proteína C Reativa
CANINOS	Amiloide A Sérico, Proteína C Reativa	Ceruloplasmina Alfa-1 Glicoproteína Ácida Haptoglobina
FELINOS	Alfa-1 Glicoproteína Ácida Amiloide A Sérico	Haptoglobina
AVES	Ceruloplasmina	Alfa-1 Glicoproteína Ácida Amiloide A Sérico Haptoglobina /PIT 54 Transferrina
EQUINOS	Amiloide A Sérico	Alfa-1 Glicoproteína Ácida Ceruloplasmina Haptoglobina

FONTE: (CRAY, 2012; CHAMANZA,1999)

A Figura 1 apresenta a classificação, em horas, das PFAs de acordo com as suas alterações nas concentrações sanguíneas durante o processo inflamatório.

Figura 1- Alteração da concentração de proteínas de fase aguda durante as diferentes fases do processo inflamatório



Fonte: (ECKERSALL e BELL, 2010; ECKERSALL, 2008)

2.1.1 Proteína C Reativa (CRP)

A proteína C reativa, uma alfa-globulina, é composta por cinco subunidades combinantes formando uma estrutura pentaédrica (CRAY, 2012) e possui um peso molecular de 115 kDa (PETERSEN et al., 2004).

Foi a primeira proteína a ser identificada e descrita ligada ao polissacarídeo C da bactéria *Streptococcus pneumoniae* (TILLET e FRANCIS, 1930). Age ligando-se a polissacarídeos residuais de bactérias, fungos e parasitas, ativando o sistema complemento, com atuação também na fagocitose (CRAY, 2012).

Aves infectadas por coccídeos e histomonas apresentaram elevação nas concentrações séricas de CRP (CHAMANZA et al., 1999).

2.1.2 Amiloide A sérico (SAA)

O amiloide A sérico é uma lipoproteína de alta densidade e possui um peso molecular de 118 kDa (GRUYS et al., 2005; PETERSEN et al., 2004).

Participa do transporte de colesterol dos tecidos para os hepatócitos, da inibição do metabolismo oxidativo dos fagócitos, ativação de plaquetas e possui ação antibacteriana ao ligar-se com bactérias gram-negativas levando a opsonização das bactérias (ECKERSALL, 2008; GRUYS et al., 2005).

A proteína SAA possui quatro isoformas, sendo: SAA₁, SAA₂, SAA₃ e SAA₄. A SAA₁ e SAA₂ respondem a uma reação de fase aguda ao serem produzidas e liberadas pelo fígado. A SAA₃ é produzida por tecidos extra-hepáticos durante a resposta de fase aguda, como pulmões, tecido adiposo e glândula mamária e está presente no colostro, estimulando a produção de mucina pelas células intestinais do neonato prevenindo a colonização bacteriana. A SAA₄ não é afetada pela resposta de fase aguda (ECKERSALL, 2008; GRUYS et al., 2005; PETERSEN et al., 2004).

Trata-se de uma PFA positiva em aves, pois está associada à deposição de amiloide em patos e outras espécies de aves domésticas. Suas concentrações em aves saudáveis são baixas, mas estudos demonstraram elevações das suas concentrações sanguíneas em casos de artropatia amiloide (CHAMANZA et al., 1999).

2.1.3 Haptoglobina (HP)/PIT 54

A hemoglobina é uma proteína presente nos eritrócitos que transporta oxigênio pelos tecidos, e na presença de doenças que promovem a lise destas células, esta é liberada, podendo oxidar lipídios e proteínas, causando danos aos tecidos (WICHER e FRIES, 2006). A haptoglobina, é uma alfa-2 globulina com peso molecular de 44kD, tem como uma de suas funções se ligar à hemoglobina impedindo esses danos oxidativos aos tecidos (ECKERSALL, 2008; MURATA et al., 2004; PETERSEN et al., 2004).

A haptoglobina possui efeito bacteriostático devido a sua capacidade de tornar o ferro indisponível, necessário para o crescimento bacteriano pela sua ligação com a hemoglobina (PETERSEN et al., 2004). Ela também apresenta capacidade anti-inflamatória quando se une as integrinas CD_{11b} e CD₁₈ que promovem a adesão dos neutrófilos às células endoteliais (GRUYS et al., 2005; MURATA et al., 2004).

A haptoglobina é encontrada em diferentes espécies animais. No entanto, estudos realizados em galinhas e em sapos não observaram a presença desta proteína (WICHER e FRIES, 2010).

Concentrações séricas de uma proteína que se liga a hemoglobina nas aves foram detectadas após indução de inflamação com terebentina em frangos de corte. Após o isolamento desta proteína e análise genética, observou-se que esta proteína era diferente da haptoglobina de mamíferos e que as aves não possuíam em seu genoma nenhum gene que codificasse a haptoglobina. Esta proteína foi analisada pela técnica SDS/PAGE e apresentou peso molecular de 69 kDa, recebendo a denominação de PIT54, pelo do banco de dados GenBank. De acordo com estes isolamentos e estudos sobre a PIT 54, demonstrou-se que ela tem propriedades antioxidantes, inibindo a produção de superóxido pelos fagócitos. No ganso doméstico (*Anser anser*) detectou-se uma proteína ortóloga a PIT54 com banda de 70 kDa pela técnica SDS/PAGE. Em avestruzes (*Struthio camelus*), foi detectada a haptoglobina e a ortóloga a PIT54, como no ganso doméstico. No emu (*Dromaius novaehollandiae*), foi observada apenas a proteína ortóloga a PIT54 (CRAY, 2012; WICHER e FRIES, 2010 e 2006).

2.1.4 Ceruloplasmina (CP)

A ceruloplasmina é uma alfa-2 glicoproteína, possui um peso molecular de 151kDa (CERÓN et al., 2005), contém cobre e histaminase, liga-se ao ferro e aos radicais livres (GRUYS et al., 2005).

Em aves, é uma proteína de fase aguda positiva maior, pois aumenta sua concentração rapidamente durante uma inflamação (CRAY, 2012; CHAMANZA et al., 1999).

A infecção em aves domésticas por *Eimeria acervulina* e *Eimeria tenella* promoveu elevações nas concentrações de ceruloplasmina, além ter alterado as concentrações de zinco, ferro e cobre. Este fato foi atribuído a uma infecção bacteriana secundária e injúria tecidual causada pelos parasitas (CHAMANZA et al., 1999). Porém BYRNES et al., 1993 *apud* CHAMANZA et al., 1999 demonstraram a existência de estimulação da produção de PFAs ao reproduzir *in vitro* a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF- α por macrófagos estimulados por *Eimeria tenella* e *Eimeria maxima*.

Observou-se aumento das concentrações séricas de ceruloplasmina em frangos de corte inoculados experimentalmente com *Salmonella enterica* serovar *Gallinarum*, causado pela lesão tecidual provocada pelas bactérias (GARCIA et al., 2009). Ademais, as concentrações de proteínas do soro podem variar conforme a dieta, e níveis elevados de cobre na dieta podem aumentar as concentrações de ceruloplasmina (CHAMANZA et al., 1999).

2.1.5 Alfa-1 glicoproteína ácida (α 1-AGP)

A alfa-1 glicoproteína ácida possui um peso molecular de 43kDa e é encontrada na maioria das espécies animais. Altera a função das células T, ligando-se a esteroides como a progesterona (GRUYS et al., 2005) e a metabólitos como a heparina, histamina e serotonina (CRAY, 2012; ECKERSALL, 2008) e tem capacidade de se ligar a agentes farmacológicos, o que pode causar implicações terapêuticas, limitando a concentração livre da droga. Promove a

ativação de neutrófilos e a inibição da agregação de plaquetas (ECKERSALL, 2008; MURATA et al., 2004).

Não se trata de uma proteína de maior concentração em aves como nos mamíferos, mas é uma proteína que cuja elevação da concentração pode indicar alguma inflamação grave em aves domésticas. Porém, como a alfa-1 glicoproteína ácida participa da imunorregulação e da regulação da resposta inflamatória, este aumento ocorre principalmente no início da inflamação (MURATA et al., 2004; CHAMANZA et al., 1999).

A infecção bacteriana provocada pela *E. coli* ou por sua endotoxina induziram a produção e o aumento das concentrações de alfa-1 glicoproteína ácida em aves domésticas e em perus, bem como infecções virais como a síndrome da rinotraqueíte infecciosa em perus. Aves domésticas infectadas com os vírus da bronquite infecciosa, laringotraqueíte infecciosa e gumboro também apresentaram elevações séricas nas concentrações desta proteína (CHAMANZA et al., 1999).

2.1.6 Transferrina

É uma beta-globulina, que se liga ao ferro livre, privando as bactérias deste mineral (CHAMANZA et al., 1999; GRUYS et al., 2005).

A transferrina é uma PFA negativa em mamíferos. No entanto, em aves, ela se comporta como PFA positiva, aumentando suas concentrações séricas na infecção pelo reovírus aviário (MURATA et al., 2004; CHAMANZA et al., 1999). Por outro lado, esse aumento não foi observado na inoculação experimental por *Salmonella enterica* serovar *Gallinarum* em frangos de corte (GARCIA et al., 2009).

Sugere-se que esta capacidade de se ligar ao ferro tornando-o indisponível, aliado ao seu aumento de concentração, confere a ela característica de PFA positiva (CHAMANZA et al., 1999; MURATA et al., 2004).

2.1.7 Ovotransferrina (OVT)

A ovotransferrina é uma proteína de peso molecular variável entre 65 kDa a 72 kDa (XIE et al., 2002).

As funções da ovotransferrina e sua importância durante a inflamação não estão totalmente descritas, mas apresenta possível origem no mesmo precursor da transferrina. Presume-se que também apresente a capacidade de ligar-se a moléculas de ferro (SCHMIDT et al., 2012; XIE et al., 2002).

Mesmo sem estar identificada em todas as espécies de aves, estudos (SCHMIDT et al., 2012), demonstraram que esta proteína se comporta como uma PFA, aumentando suas concentrações séricas na presença de inflamações induzidas por doenças bacterianas, virais, parasitárias ou químicas. Esta elevação sérica da ovotransferrina foi demonstrada por Rath et al. (2009) em frangos inoculados com *Escherichia coli* e em galinhas desafiadas com *Eimeria maxima* e *Eimeria tenella*.

2.2 Doença de Newcastle

A Doença de Newcastle (DN) também é conhecida como pseudo-pestes aviária, pneumoencefalite aviária, desordem respiratório-nervosa, peste das aves e Newcastle Disease. Faz parte da lista de doenças emergenciais do código zoosanitário internacional da Organização Mundial de Saúde Animal (WOAH) e a notificação dos focos da doença é compulsória (WOAH, 2010).

É causada por Paramyxovirus aviário tipo 1 (APMV-1), do gênero *Avulavirus* (ICTV, 2013). Fatores como virulência da amostra, espécie acometida, "status" imunológico, predileção do vírus pelo sistema respiratório, sistema digestivo ou sistema nervoso central, causam grande variação na apresentação de sinais clínicos (SWAYNE e KING, 2003).

Segundo Alexander (2009), mais de 250 espécies de aves são suscetíveis à infecção. Schmidt (1999) relata que as principais seriam as aves domésticas como patos, gansos, pombas, faisões e galinhas, mas também corujas, papagaios e águias. Outros animais, como pequenos roedores, insetos e artrópodes, os quais transitam entre aves infectadas e aves susceptíveis, podem representar um potencial para a difusão da DN, transmitindo mecanicamente o vírus. Além disso, o movimento de pessoas com seus calçados, roupas e veículos e o transporte de equipamentos entre granjas contaminadas, podem ser meios de difusão do vírus nas panzootias (PAULILLO e DORETTO JUNIOR, 2009).

Não existem sinais patognomônicos para a doença de Newcastle sendo esta muito semelhante com outras doenças que afetam as aves. Os sinais clínicos mais comuns são os respiratórios, neurológicos, redução da produção de ovos, prostração e morte, das aves acometidas com um vírus mais patogênico.

Para o controle da doença de Newcastle, além das medidas de biossegurança, a vacinação é um método eficiente (PAULILLO e DORETTO JÚNIOR, 2009). A propósito, Alexander (2009) relata três tipos de vacinas disponíveis para a doença de Newcastle: lentogênica viva, mesogênica viva e inativada.

As vacinas lentogênicas vivas são, em geral, derivadas de vírus de campo e têm demonstrado uma baixa patogenicidade para aves. As cepas vacinais são Hitchner B1 e LaSota, F, e cepas baseadas nos vírus V4 ou Ulster 2C. As vacinas inativadas são preparadas por crescimento de vírus em ovo com

utilização de vírus virulento e não virulento, sendo elaboradas em emulsões com óleo mineral (ALEXANDER, 2009).

Entretanto, as vacinas são desenvolvidas primariamente para galinhas, mas podem ser utilizadas em outras espécies de aves, desde que se realizem testes e monitoramento dos programas imunoproláticos (ALEXANDER, 2003). E por isso, precisam ser testadas e avaliadas quanto sua eficácia na produção de imunidade.

Winterfield e Fadly (1972), demonstraram que a vacinação com a cepa LaSota produziu proteção adequada em perus jovens com quatro a cinco semanas de idade e o mesmo foi demonstrado por Schmidt et al. (2010) em perus fêmeas em fase de produção.

A literatura relata alguns estudos de determinação da concentração das PFAs em espécies como bovinos, caninos, felinos e suínos após agressão tecidual (ECKERSALL, 2012; MURATA et al., 2004), seja infecciosa, traumática, neoplásica. No entanto, são escassas as publicações correlacionando vacinação e determinação da concentração dessas proteínas. Em equinos (ANDERSEN et al., 2011), a resposta de fase aguda foi investigada, especificamente as concentrações séricas de fibrinogênio, amiloide A sérico e albumina após a utilização de vacinas comerciais combinadas com o vírus da influenza equina e toxina tetânica. E em galinhas (SYLTE e SUAREZ, 2012), verificou efeitos da vacinação sobre as concentrações séricas das PFAs, com a utilização de dois tipos de vacinas, de alta e de baixa patogenicidade do vírus da influenza aviária.

O objetivo desta pesquisa é o de avaliar o eletroforetograma de proteínas séricas em perus fêmeas na fase de produção entre 32 e 52 semanas de idade, vacinadas contra o vírus da doença de Newcastle com cepa LaSota ativada e inativada, para avaliar o programa de vacinação proposto.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Manejo das aves

O experimento foi desenvolvido no aviário experimental do Departamento de Patologia Veterinária da Universidade Estadual Paulista – FCAV – Câmpus de Jaboticabal e nas dependências do Laboratório de Pesquisa do Departamento de Patologia Veterinária da Unesp – FCAV – Câmpus Jaboticabal. Sua duração foi de 52 semanas (período pré-experimental e experimental).

As aves foram alojadas em um galpão de alvenaria convencionalmente utilizado em ensaios com frangos de corte, permanecendo 15 animais por boxe de galpão.

Durante o período experimental (32º a 52º semana de vida das aves), os grupos de perus foram mantidos isolados entre si e do grupo controle para evitar a influência de um tratamento sobre o outro. Foi realizado o manejo diário das aves com o fornecimento de ração e água, organização dos boxes experimentais e observação dos animais, duas vezes ao dia.

As aves, em período pré-experimental ou não e até o final do ensaio, receberam água e ração *ad libitum*. A dieta, à base de milho e farelo de soja, seguiu as recomendações de exigências nutricionais, conforme NRC (1994).

A postura dos ovos iniciou-se a partir da 32º semana de vida das aves.

3.2 Vacinas e Vacinação

Foram utilizadas 45 perus fêmeas, da linhagem Bronze. As aves foram vacinadas durante o período pré-experimental (0-20ª semana de vida) contra a doença de Newcastle com vírus vivo (estirpe vacinal LaSota) aos 10, 35, 90 e 140 dias de idade. Foram também vacinadas contra boubá aviária aos 14 e 70 dias de idade, contra a doença de gumboro aos sete e 21 dias de idade, contra

rinotraqueíte infecciosa dos perus aos sete dias de idade e contra enterite hemorrágica dos perus aos 10 dias de idade.

Os perus, ao final do período pré-experimental, foram separados para a formação de parcelas homogêneas e distribuídos, aleatoriamente em três tratamentos (grupos) com 15 aves por parcela. O mesmo critério foi adotado para os perus do grupo controle, mantido em condições de manejo idêntico ao utilizado para os demais grupos.

Para o período experimental, foram utilizadas vacinas vivas atenuadas provenientes de um mesmo laboratório de frascos de única partida, estando todos no início de validade. Foram empregadas no experimento as vacinas (liofilizadas) preparadas com a estirpe lentogênica LaSota, do vírus da doença de Newcastle, ativada e inativada e emulsionada em óleo mineral (Tabela 2).

3.2.1 Vacina Inativada oleosa

Foi utilizada para o presente estudo, vacina (oleosa) preparada com a estirpe lentogênica LaSota, do Vírus da Doença de Newcastle, inativada e emulsionada em óleo mineral, cuja DP_{50} foi de 56,24/0,5 mL.

3.2.1.1 Vacinação via subcutânea

A vacinação foi realizada na região cervical dos perus por via subcutânea. Com auxílio de seringa tipo automático, foi injetado 0,5 mL do vírus emulsionado em óleo mineral/ave, correspondente a uma dose vacinal por ave.

3.2.2 Vacinas Vivas

Foi utilizada vacina viva atenuada proveniente do mesmo laboratório e de frascos de uma única partida, estando todos no início do período de validade.

A vacina (liofilizada) preparada com estirpe vacinal LaSota do vírus da doença de Newcastle foi empregada no experimento. O título dessa vacina, obtido

mediante determinação de sua dose infectante 50% (EID₅₀) em ovos embrionados de galinhas “Specific-Pathogen-Free”(SPF), de oito a 10 dias de incubação, foi de :

$$\text{EID}_{50}(\text{LaSota}) = 10^{7,35}/0,1\text{mL}$$

3.2.2.1 Vacinação via ocular

A vacinação via ocular foi realizada a partir da diluição da vacina liofilizada, utilizando-se diluente fornecido pelo fabricante na proporção de 30mL/1000 doses vacinais/1000 aves, correspondente a 0,03 mL de dose vacinal ocular, conforme metodologia utilizada por PAULILLO (1980; 1984; 1988) e por PAULILLO et al. (1982; 1987; 1996; 2002).

TABELA 2- Distribuição dos perus fêmeas em diferentes grupos experimentais, vacinados contra DN na 32ª semana e revacinadas na 40ª e 48ª semana de idade, com diferentes estirpes vacinais.

Vacinação (32ª semana)	Via de administração	Revacinação (40ª e 48ª semanas)	
LaSota (ativada)	Ocular	LaSota	LaSota
Oleosa + LaSota (inativada)	Subcutânea	-----	-----
Controle*	-----	-----	-----

*Não recebeu vacina

3.3 Inibição da Hemaglutinação (HI)

Foram realizadas 11 colheitas de sangue, a partir da 32ª semana de idade das aves, com intervalos regulares de 14 dias, para obtenção do soro para

realização da pesquisa de anticorpos inibidores da hemaglutinação (teste HI), totalizando 203 amostras. Os soros obtidos foram inativados a 56° C por 30 minutos e congelados a -20° C até o momento do uso.

Os testes de HI referentes aos soros obtidos foram processados no Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV- Unesp, Câmpus Jaboticabal.

O antígeno usado na reação de inibição da hemaglutinação foi a estirpe lentogênica LaSota do vírus da doença de Newcastle, mantida em laboratório por passagens sucessivas em líquido alantoide de embrião de galinha SPF, com oito a 10 dias de desenvolvimento. Para esta reação, foi empregado o método β , utilizando-se a microtécnica, de acordo com a técnica padronizada por Cunningham (1971). Com auxílio de pipetador multicalibrado 25 μ l, foram feitas diluições duplas dos soros em solução salina tamponada (PBS) pH 7,2. Acrescentou-se a cada diluição do soro 25 μ l do antígeno com quatro unidades hemaglutinantes (UHA) e incubou-se o sistema a temperatura de 4° C, durante 20 minutos. Decorrido este prazo, adicionou-se 25 μ l de suspensão de hemácias de peru a 0,05%, padronizada em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 545 nm, para uma absorbância entre 0,18 e 0,20. A seguir, incubou-se novamente o sistema a 4° C, e procedeu-se a leitura após a deposição total de hemácias nos testemunhos (45 minutos).

O título foi expresso mediante a multiplicação do número de UHA utilizadas pela recíproca da maior diluição do soro que inibe completamente a hemaglutinação e transformados em log de base 2.

3.4 Estudo do perfil eletroforético das proteínas séricas

As amostras do soro referentes às colheitas realizadas entre a 32^a a 52^a semanas foram processadas para determinação do perfil eletroforético das proteínas pelo método de gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS- PAGE).

Para o fracionamento das proteínas séricas utilizou-se a técnica (SDS- PAGE), proposto por Weber e Osborn (1969). Após o fracionamento, o gel foi corado durante 10 minutos em solução de Coomassie Blue 0,25% e,

posteriormente, foi colocado em solução de Ácido acético 7% para retirar o excesso do corante, até que as frações protéicas se apresentassem nítidas. Os pesos moleculares e as concentrações das frações proteicas foram determinados em videodensitômetro computadorizado (Shimadzu® CS9301, Tóquio, Japão). Para a identificação das proteínas, foi utilizada uma solução marcadora de referência (Sigma® S8445, St. Louis, EUA) com diferentes pesos moleculares de 20 kilodáltons (20kD), 24 kD, 29 kD, 45 kD, 55 kD, 66 kD, 97 kD, 116 kD e 200 kD e por comparação pela mobilidade eletroforética da albumina purificada, IgG, haptoglobina, transferrina, ceruloplasmina e alfa-1 antitripsina (Sigma®). Para a avaliação densitométrica das bandas proteicas, foram confeccionadas curvas de referência a partir da leitura do marcador padrão, bem como da mobilidade eletroforética supracitada.

As concentrações das proteínas séricas totais foram determinadas pela reação do biureto (Gornall et al., 1949), utilizando-se kit bioquímico comercial (Labtest®) e leitura em espectrofotômetro automático (Cobas Roche®).

3.5 Determinação da ovotransferrina

As concentrações séricas de ovotransferrina foram determinadas utilizando-se ovotransferrina purificada de galinha livre de ferro da Sigma-Aldrich ® (St. Louis, MO, EUA), utilizando a técnica de gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS- PAGE), corado com azul de Coomassie.

3.6 Delineamento experimental

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos e 15 aves por parcela.

Os dados do perfil eletroforético das proteínas foram analisados pelo ANOVA e aqueles com diferença significativa foram submetidos ao Teste de Tukey com 0,05% de significância ($p < 0,05$) (Statview® 5.0).

Na verificação do grau de imunidade pós-vacinal nos diferentes lotes de perus experimentais, foi aplicado um modelo de análise de variância descrito por Stell & Torrie (1980). Nos casos em que foram constatadas diferenças

significativas, foram executados contrastes, pelo Teste de Tukey, com 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS

4.1 Reação inibição da hemaglutinação (HI)

A Tabela 3 apresenta as médias geométricas dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI) ($\log_2$) dos soros das fêmeas de perus (*Meleagris gallopavo*) submetidas a diferentes programas de vacinação, contra a doença de Newcastle, em período compreendido entre 32 a 52 semanas de idade, nos diferentes grupos (n=45). Nota-se que as aves, independentemente do tratamento vacinal, apresentaram-se destituídas de anticorpos aferidos pela reação de HI na 32ª semana de idade.

Tabela 3 - Médias geométricas dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI) ($\log_2$) dos soros das fêmeas de perus (*Meleagris gallopavo*) submetidas a dois programas de vacinação, contra a doença de Newcastle, em período compreendido entre 32 a 52 semanas de idade, nos diferentes grupos (n=45)

	Idade das aves (semanas)										
	32	34	36	38	40	42	44	46	48	50	52
LaSota	0,0	7,2a	7,2a	8,0a	8,3a	7,5a	6,6a	6,4a	6,8a	7,9a	6,1a
Ativada											
LaSota	0,0	0,0b	10,7b	10,5b	10,4b	9,2b	9,7b	8,1b	9,1b	10,2b	8,9b
Inativada											
Controle	0,0	0,0b	0,0c	0,0c	0,0c	0,0c	0,0c	0,0c	0,0c	0,0c	0,0c

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

4.2 Eletroforese de proteínas séricas

As Tabelas 4 a 7 apresentam os resultados das concentrações séricas das proteínas totais e suas frações: IgA, ceruloplasmina, transferrina, ovotransferrina, albumina, IgG de cadeia pesada, haptoglobina/PIT 54, alfa-1 glicoproteína ácida, IgG de cadeia leve e uma proteína não identificada nominalmente com peso

molecular de 23kDa, das fêmeas de perus na fase de produção, entre 32 e 52 semanas de idade, vacinadas ou não contra a doença de Newcastle.

Tabela 4 – Concentração (médias $\pm$ desvio padrão) das proteínas séricas totais (g/dL) e das frações proteicas (mg/dL) IgA e ceruloplasmina de perus fêmeas em fase de produção, entre 32 e 52 semanas de idade (n=45)

		SEMANAS										
		32	34	36	38	40	42	44	46	48	50	52
Proteína total (g/dL)		4,22	4,92	4,30	4,86	5,45	6,00	5,16	5,19	6,04	5,38	6,49
	C	± 1,00	± 1,2	± 0,88	± 0,17	± 0,57	± 0,9	± 1,05	± 0,76a	± 0,75	± 0,91	± 0,58
		5,70	5,43	5,56	4,97	5,51	5,47	5,56	6,91	6,46	5,60	6,65
	I	± 1,60	± 1,3	± 0,19	± 0,73	± 0,55	± 0,7	± 1,25	± 1,2b	± 1,2	± 0,32	± 0,95
		4,62	4,87	4,96	5,38	5,41	6,07	5,82	5,88	5,18	5,84	6,30
	A	± 0,72	± 0,2	± 0,68	± 0,73	± 0,86	± 1,0	± 0,74	± 0,84ab	± 0,8	± 1,00	± 0,9
IgA (mg/dL)		38,13	63,45	64,84	59,05	45,19	73,90	44,87	56,47	66,74	48,71	63,19
	C	± 24,41	± 18,3	± 17,9	± 27,79	± 19,13	± 27,2	± 34,01	± 32,4	± 23,7	± 23,08	± 27,46
		65,85	62,78	68,76	71,84	48,26	81,90	47,78	68,35	40,03	68,54	91,97
	I	± 14,61	± 27,1	± 17,22	± 20,05	± 17,57	± 12,0	± 22,28	± 38,64	± 23,3	± 33,19	± 47,02
		50,08	65,66	49,09	67,24	60,92	66,37	55,12	47,75	50,43	33,62	50,00
	A	± 20,9	± 8,4	± 24,47	± 15,53	± 33,54	± 19,4	± 20,0	± 29,05	± 37,6	± 22,51	± 29,00
Ceruloplasmina (mg/dL)		22,61	27,82	20,55	20,17	25,77	34,90	24,69	29,61	47,18	30,85	37,42
	C	± 11,95	± 8,4	± 11,9	± 5,98	± 9,23	± 12,5	± 14,63	± 10,0	± 27,8	± 11,85	± 15,8
		26,57	34,88	21,86	24,37	33,50	63,80	25,05	37,40	32,03	41,56	30,80
	I	± 9,19	± 9,8	± 7,18	± 4,04	± 19,74	± 82,6	± 7,46	± 11,2	± 23,2	± 35,96	± 10,4
		15,60	29,80	19,76	21,72	86,47	37,30	35,21	33,98	29,74	29,59	54,70
	A	± 4,86	± 2,7	± 4,97	± 6,67	± 88,31	± 6,9	± 15,0	± 14,9	± 15,6	± 34,29	± 27,5

C grupo controle; I grupo vacinado cepa LaSota inativada; A grupo vacinado cepa LaSota ativada. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

Tabela 5 - Concentração (médias $\pm$ desvio padrão) das frações proteicas (mg/dL) transferrina, ovotransferrina e albumina (g/dL) de perus fêmeas em fase de produção, entre 32 e 52 semanas de idade (n=45)

		SEMANAS										
		32	34	36	38	40	42	44	46	48	50	52
Transferrina (mg/dL)		50,57	110,90	46,76	48,85	31,09	42,94	44,41	35,21	81,30	110,05	75,58
	C	± 22,2	± 62,8	± 12,7	± 6,0	± 16,6	± 36,7	± 23,13	± 16,2	± 64,6	± 54,49	± 31,1
		43,51	125,70	44,49	40,37	47,00	31,92	41,84	112,05	137,76	105,12	160,85
	I	± 8,2	±112,7	± 16,5	± 19,07	± 27,58	± 19,86	± 14,2	± 155,5	± 70,7	± 61,78	± 78,68
		39,67	41,14	48,91	35,99	20,97	50,14	54,30	45,04	57,08	85,42	92,36
	A	± 24,09	±25,33	± 28,4	± 16,29	± 9,77	± 36,10	± 62,2	± 18,08	± 30,2	± 44,5	± 67,9
Ovotransferrina (mg/dL)		572,83	393,70	574,30	453,24	495,72	463,40	431,43	402,80	768,90	827,03	742,23
	C	± 242,7	± 260,0	± 298,7	± 128,96	± 260,6	± 75,8	± 158,2	± 105,6	± 296,8ab	± 243,3	± 284,96
		482,45	415,30	321,30	618,19	341,56	515,60	497,22	722,04	1040,80	822,23	558,17
	I	± 302,17	±252,9	± 74,5	± 364,12	± 59,28	± 284,9	± 210,7	± 289,34	± 258,3a	± 300,44	± 112,17
		645,47	567,80	457,49	579,92	482,29	669,00	435,81	576,43	549,45	881,68	612,10
	A	± 277,25	±250,2	± 254,4	± 363,73	± 146,55	± 240,2	±154,0	± 248,8	± 172,8b	± 268,55	± 277,48
Albumina (g/dL)		2,30	3,05	2,28	2,97	2,97	3,20	2,60	2,81	3,48	3,04	3,61
	C	± 0,63	± 0,77	± 0,64	± 0,26	± 0,52	± 0,55	± 0,43	± 0,6	± 0,6a	± 0,41	± 0,49
		3,01	2,76	2,74	2,81	30,60	3,26	2,80	3,60	3,43	3,29	3,25
	I	± 1,2	±0,43	± 0,26	± 0,42	± 0,39	± 0,37	± 0,59	± 0,73	± 0,5a	± 0,24	± 0,26
		2,40	2,41	2,61	30,09	2,97	3,29	2,97	2,88	2,5	3,31	3,22
	A	± 0,8	±0,29	± 0,19	± 0,3	± 0,6	± 0,46	± 0,35	± 0,79	± 0,5a	± 0,33	± 0,36

C grupo controle; I grupo vacinado cepa LaSota inativada; A grupo vacinado cepa LaSota ativada. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

Tabela 6 – Concentração (médias $\pm$ desvio padrão) das frações proteicas (mg/dL) IgG de cadeia pesada, haptoglobina/PIT 54 e Alfa-1 glicoproteína ácida de perus fêmeas em fase de produção, entre 32 e 52 semanas de idade (n=45)

		SEMANAS										
		32	34	36	38	40	42	44	46	48	50	52
IgG cadeia pesada (mg/dL)		73,65	51,62	119,73	61,01	63,88	150,26	88,00	102,00	161,94	123,26	149,34
	C	± 48,69	± 63,75	± 79,21	± 32,8ac	± 42,63	± 83,1	± 47,6	± 19,7	± 29,92	± 17,6	± 31,62
		29,24	70,06	53,13	54,30	109,51	101,23	123,43	171,12	144,36	80,18	167,07
	I	± 21,98	±58,03	± 35,6	± 30,29a	± 29,3	± 36,1	± 26,1	± 58,8	± 59,73	± 61,4	± 125,7
		55,82	109,51	87,76	126,81	96,64	136,54	78,70	169,90	140,42	145,86	261,70
	A	± 44,31	±18,74	± 47,1	± 72,2bc	± 62,63	± 14,0	± 32,0	± 94,3	± 46,6	± 78,04	± 120,1
Haptoglobina/ PIT 54 (mg/dL)		15,72	14,89	26,18	20,64	33,37	32,16	33,65	46,10	46,64	30,32	53,20
	C	± 9,55	± 4,17	± 6,95	± 6,3	± 9,98	± 7,38	± 15,1	± 19,8	± 18,4	± 11,65	± 20,33
		16,43	27,48	19,65	23,42	33,12	31,89	42,62	50,84	41,11	26,52	40,06
	I	± 5,9	±16,5	± 7,58	± 10,4	± 10,74	± 11,75	± 9,4	± 26,5	± 10,7	± 9,81	± 6,29
		21,50	21,80	24,12	19,95	22,76	34,51	42,16	40,60	38,31	31,00	42,32
	A	± 15,9	±4,1	± 5,72	± 7,3	± 10,19	± 5,6	± 10,8	± 9,9	± 22,6	± 18,56	± 6,49
Alfa-1 glicoproteína ácida (mg/dL)		14,34	18,73	20,49	16,23	27,11	26,90	39,08	26,15	28,08	28,90	24,43
	C	± 7,0	± 9,25	± 4,25ac	± 4,9	± 9,8	± 14,0	± 15,1	± 5,7	± 7,25	± 8,18	± 3,86a
		16,83	23,37	15,49	24,59	30,01	28,79	25,37	40,71	22,49	24,96	42,66
	I	± 7,0	±13,7	± 4,26a	± 17,4	± 7,78	± 5,79	± 6,45	± 26,4	± 12,5	± 9,82	± 14,84b
		13,53	19,83	23,16	17,18	33,10	31,69	45,07	33,80	23,84	26,68	32,57
	A	± 7,2	±5,78	± 4,22bc	± 6,09	± 15,22	± 8,77	± 44,08	± 8,5	± 12,45	± 12,96	± 14,15ab

C grupo controle; I grupo vacinado cepa LaSota inativada; A grupo vacinado cepa LaSota ativada. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

Tabela 7 – Concentração (médias $\pm$ desvio padrão) das frações proteicas (mg/dL) IgG de cadeia leve e PM 23kDa de perus fêmeas em fase de produção, entre 32 e 52 semanas de idade (n=45)

		SEMANAS										
		32	34	36	38	40	42	44	46	48	50	52
IgG cadeia leve (mg/dL)		163,25	160,58	204,99	155,05	279,18	281,38	421,20	390,50	324,48	435,17	491,94
	C	± 131,8	± 98,6	± 118,62	± 18,52	± 119,93	± 87,8	± 236,2	± 190,8	± 71,7ac	± 245,26	± 311,8
		134,30	173,55	171,80	174,15	310,50	206,21	630,50	588,80	696,00	353,13	804,06
	I	± 66,2	±115,6	± 43,59	± 79,1	± 155,63	± 65,2	± 475,1	± 345,7	± 345,6b	± 74,2	± 471,56
		168,70	135,22	281,94	191,90	284,09	312,40	349,09	485,90	592,12	549,49	488,83
	A	± 75,9	±37,6	± 181,66	± 116,3	± 126,02	± 174,0	± 156,63	± 133,4	± 153,9bc	± 378,41	± 195,39
PM 23kDa (mg/dL)		471,00	480,61	380,70	614,97	538,20	660,32	287,19	281,80	280,85	224,31	262,14
	C	± 170,8	± 141,8	± 123,0	± 28,31	± 186,94	± 243,8	± 125,36	± 138,5	± 172,4	± 104,27	± 146,54
		698,40	711,62	571,10	527,20	523,59	522,96	229,30	273,10	209,90	155,89	226,60
	I	± 152,8	±232,2	± 113,0	± 164,20	± 265,86	± 118,97	± 125,7	± 174,9	± 188	± 108,49	± 101,68
		555,10	567,90	477,70	583,94	400,39	510,18	366,20	201,40	166,70	197,36	171,19
	A	± 179,5	±115,6	± 187,8	± 238,67	± 229,33	± 271,4	± 164,5	± 61,4	± 75,74	± 113,6	± 46,54

C grupo controle; I grupo vacinado cepa LaSota inativada; A grupo vacinado cepa LaSota ativada. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

5. DISCUSSÃO

A partir da 34ª semana de idade, os títulos de HI (Tabela 3) dos soros dos perus fêmeas vacinadas com a cepa LaSota ativada foram decorrentes da imunização ativa. Nota-se que o grupo controle não apresentou níveis de anticorpos séricos detectáveis após a vacinação contra a DN. Este resultado era esperado, pois tais aves não foram imunizadas contra DN. Por outro lado, os dois grupos de perus que receberam vacinas, em processo de vacinação e revacinação contra DN, em linhas gerais, responderam ao estímulo antigênico, produzindo títulos de anticorpos aferidos pelo HI.

Analisando a Tabela 3, observa-se, ainda, que os resultados apresentados correspondem ao período experimental completo e que as melhores médias registradas ($\log_2 10,7$ e $\log_2 10,5$) foram altas, sendo obtidas nas 36ª e 38ª semanas, respectivamente, com a estirpe LaSota inativada (oleosa). De um modo geral, os títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação obtidos na imunização com vacina a vírus inativado em excipiente oleoso, são elevados e maiores do que aqueles obtidos na imunização com vacina a vírus vivo. Esses resultados corroboram com os achados experimentais de Eidson et al. (1980) e Paulillo (1988). Nota-se também que as aves deste ensaio que receberam vacina com vírus inativado apresentaram um aumento mais tardio do que a cepa ativada em relação aos níveis de anticorpos inibidores de hemaglutinação, os quais permanecem elevados e estáveis até o final do experimento. De acordo com Warden et al. (1975), os adjuvantes oleosos formam uma emulsão estável e difícil de se romper, da qual o antígeno é liberado lentamente, observando-se assim um estímulo prolongado do sistema imune o que determina uma resposta mais intensa e de maior duração.

As aves que receberam exclusivamente vacinas a vírus vivo (estirpe LaSota) responderam ao estímulo antigênico (Tabela 3). As características da amostra vacinal ensaiada, qual seja, o grande potencial de difusão da estirpe LaSota (WINTERFIELD et al. 1957) estão compatíveis com os títulos elevados, ou seja da ordem de $\log_2 8,6$ de anticorpos aferidos pelo teste HI e detectados nos soros das aves.

A propósito, esses resultados permitem concluir que nos programas imunoproláticos ensaiados, mediante o emprego das amostras vacinais LaSota e

LaSota inativada, foram igualmente eficientes no estímulo da resposta imune humoral (HI). Adicionalmente, as vacinações utilizando as amostras vacinais LaSota e LaSota inativada não se mostram associadas com sinais clínicos de reação vacinal em perus.

Na 36ª semana, quatro semanas após a vacinação, houve diferença significativa ($p < 0,05$) para as concentrações da alfa-1 glicoproteína ácida (Tabela 6) entre o grupo vacinado com a cepa LaSota inativada e o grupo vacinado com a cepa LaSota ativada. Nesta mesma semana, os títulos obtidos pelo HI (Tabela 3), foram maiores para o grupo vacinado com a cepa LaSota inativada, com média geométrica de 10,7.

A alfa-1 glicoproteína ácida é uma proteína com função imunorreguladora, pois inibe a ativação dos neutrófilos e o aumento da secreção de IL-1 receptor antagonista por macrófagos (MURATA et al., 2004; CHAMANZA et al., 1999).

Sugere-se que a alfa-1 glicoproteína ácida tenha-se apresentado como uma PFA negativa em relação à resposta imune vacinal com a cepa LaSota inativada, uma vez que, apesar do elevado título de anticorpos, houve diminuição significativa ($p < 0,05$) nas concentrações desta proteína. Esses achados corroboram com os obtidos por Matthew e Suarez (2012), que observaram que em um grupo de frangos com quatro semanas de idade, vacinados contra o vírus da influenza aviária, as concentrações séricas de alfa-1 glicoproteína ácida foram significativamente inferiores quando comparados com o grupo controle. No entanto, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre o grupo vacinado com a cepa LaSota inativada e o grupo controle, e entre o grupo vacinado com a cepa LaSota ativada e as aves controles.

Na 38ª semana, seis semanas após a vacinação, observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) para as concentrações de IgG cadeia pesada (Tabela 6) entre o grupo vacinado com a cepa LaSota inativada e o grupo vacinado com a cepa LaSota ativada, sendo a maior concentração desta proteína observada no grupo vacinado com a cepa ativada. Os títulos de HI obtidos neste mesmo momento (Tabela 3) para o grupo vacinado com a cepa inativada foram superiores aos demais grupos (ativada e controle), com média geométrica de 10,5.

Esse resultado era esperado, pois o aumento das concentrações de IgG refletem a reação imunológica causada pela vacina (ECKERSALL, 2008). Desta

forma, na 38ª semana de idade, foi possível observar a eficácia da utilização do proteinograma para monitorar o programa de vacinação contra a doença de Newcastle em perus. Ainda, de acordo com Alexander (2003), a vacinação contra a doença de Newcastle deve resultar em imunidade contra infecção e replicação viral.

Na 46ª semana, as concentrações de proteínas totais (Tabela 4) apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo vacinado com a cepa LaSota inativada e o grupo controle. Neste mesmo momento, os títulos obtidos do HI (Tabela 3) foram maiores no grupo vacinado com a cepa LaSota inativada, com média geométrica de 8,1. Assim, pode-se supor que a vacinação contra a doença de Newcastle utilizando-se a cepa LaSota inativada, foi responsável pela elevação das concentrações das proteínas séricas totais (Tabela 4) causada pelo aumento das concentrações das IgG de cadeia leve e pesada (Tabelas 6 e 7), pois as concentrações de globulinas geralmente estão elevadas em condições de estímulo antigênico (LUMEIJ, 1997).

Esses resultados são compatíveis com o grande potencial de difusão da estirpe LaSota (WINTERFIELD et al., 1957). Ademais, Lumeij (1997) comenta que as concentrações das proteínas totais são alteradas, principalmente pela elevação das concentrações de globulinas, em condições inflamatórias agudas ou crônicas, pois as imunoglobulinas produzidas pelos linfócitos B e plasmócitos representam um componente significativo da concentração total de proteínas (CAMPBELL, 2004).

Na 48ª semana foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) para as concentrações da ovotransferrina (Tabela 5) entre o grupo vacinado com a cepa LaSota ativada e o grupo vacinado com a cepa LaSota inativada, sendo a maior concentração observada neste grupo. Este resultado corrobora com os dados de Rath et al. (2009), que observaram aumento da concentração sérica da ovotransferrina em aves expostas a bactérias, vírus ou inflamação por indução química, sugerindo que a ovotransferrina seja uma proteína de fase aguda positiva nas aves.

O peso molecular da ovotransferrina encontrada nos perus fêmeas do presente estudo foi de 80kD. Por outro lado, Xie et al. (2002) caracterizaram como ovotransferrina uma proteína com peso molecular de 65kD em frangos de corte com quatro semanas de idade. Schmidt et al. (2012) caracterizaram uma proteína

com peso molecular de 72kD para frangos de corte de oito dias de idade, 71kD aos 18 dias de idade e 70kD aos 37 dias de idade, como sendo a ovotransferrina.

A albumina (Tabela 5) apresentou aumento em suas concentrações séricas em todos os grupos avaliados, mas não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos. Os aumentos das concentrações séricas de ovotransferrina e da albumina não coincidem com os resultados obtidos por Xie et al. (2002), que demonstraram elevações nas concentrações séricas de ovotransferrina, e em contrapartida, a diminuição das concentrações séricas de albumina em frangos de corte com quatro semanas de idade. A mesma divergência ocorreu com a pesquisa de Andersen et al. (2011), que não encontraram diferença significativa na concentração de albumina em resposta a vacinação de cavalos contra o vírus da influenza equina e toxina tetânica.

Neste mesmo momento, ou seja, na 48ª semana (Tabela 7), as concentrações séricas da IgG de cadeia leve apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) entre o grupo vacinado com a cepa LaSota inativada em relação ao grupo controle. Da mesma forma, os títulos obtidos pelo HI (Tabela 3) também estavam elevados neste grupo, com média geométrica de 9,1. Assim, pode-se supor que a vacinação contra a doença de Newcastle utilizando-se a cepa LaSota inativada foi responsável pela elevação das concentrações desta imunoglobulina (LUMEIJ, 1997).

Na 52ª semana, houve diferença significativa ($p<0,05$) para as concentrações da alfa-1 glicoproteína ácida (Tabela 6) entre o grupo controle e o grupo vacinado com cepa LaSota inativada, que apresentou elevada concentração desta proteína. Diferentemente do que ocorreu na 36ª semana, quando o grupo vacinado com a cepa LaSota inativada apresentou menor concentração em relação ao grupo vacinado com a cepa LaSota ativada.

Os resultados encontrados para o HI (Tabela 3) das aves vacinadas com a cepa LaSota inativada foram também significativamente ($p<0,05$) superiores em relação ao grupo vacinado com a cepa ativada. Este fato pode ser explicado pela função da alfa-1 glicoproteína ácida. Ou seja, seu papel imunorregulador (MURATA et al., 2004; CHAMANZA et al., 1999) evidencia que a cepa LaSota inativada apresentou melhor eficiência na produção de anticorpos e, conseqüentemente, resposta imunológica mais efetiva.

6. CONCLUSÃO

1. A fração de ovotransferrina, de 80kD, foi identificada em todos os momentos e em todas as aves avaliadas.
2. A eletroforese de proteínas séricas, pela técnica de SDS-PAGE, pode servir como ferramenta para verificar a eficácia do programa de vacinação contra a doença de Newcastle nas 36^a, 38^a, 46^a, 48^a e 52^a semanas de idade de perus em fase de produção.

7. REFERENCIAS

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease and other avian Paramyxoviridae infections. *Diseases of poultry*. 11^a Edição, Ames, Iowa, p. 541–569. 2003.

ALEXANDER, D.J.; Doença de Newcastle. In REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. *Patologia Aviária*. São Paulo: Manole, 2009. Cap.21, p 219-228.

ANDERSEN, S.A.; PETERSEN, H.H.; ERSBOLL, A.K.; FALK-RONNE, J.; JACOBSEN, S.; Vaccination elicits a prominent acute phase response in horses. *The Veterinary Journal*, 2011.

BACK, A. Manejo Sanitário de Perus. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, n.3, p. 322-327, 2007.

BRANT, A.W. A brief history of the turkey. *World's Poultry Science*, 54: 365-373, 1998.

BYRNES,S.; EATON, R.; KOGUT, M. *In vitro* interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha production by macrophages from chickens infected with either *Eimeria maxima* or *Eimeria tenella*.1993. In: CHAMANZA, R., van VEEN, L., TIVAPASI, M.T.; TOUSSAINT, M.J.M. Acute phase proteins in the domestic fowl. *World's Poultry Science Journal*, vol.55, p.61-71, 1999.

CAMPBELL, T.W. Clinical Chemistry of Birds. In THRALL, M.A. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2004. P. 479-492.

CERÓN, J.J.; ECKERSALL, P.D.; SUBIELA, S.M. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives; *Veterinary Clinical Pathology*, vol.34, n.2, p. 85-99, 2005.

CHAMANZA, R., van VEEN, L., TIVAPASI, M.T.; TOUSSAINT, M.J.M. Acute phase proteins in the domestic fowl. *World's Poultry Science Journal*, vol.55, p.61-71, 1999.

CRAY, C. Acute phase proteins in animals. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, vol.105, p.113-150, 2012.

CUNNINGHAM, C. H. *Virologia practica*. 6. ed. Zaragoza: Acribia, 1971. 260p.

ECKERSALL, P.D. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Revue Méd Vét*, vol.151, p.577–584, 2000.

ECKERSALL, P.D.; YOUNG, F.J.; MCCOMB, C.; HOGARTH, C.J.; SAFI, S.; WEBER, A.; MCDONALD, T.; NOLAN, A.M.; FITZPATRICK, J.L. Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. *The Veterinary Record*, vol.148, p.35-41, 2001.

ECKERSALL, P. D. Proteins, Proteomics and the Dysproteinemias. In: KANEKO J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6^a ed., San Diego Academic Press, 2008. Cap. 5, p.117-155.

ECKERSALL, P. D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *The Veterinary Journal*, 185, p. 23-27, 2010.

EIDSON, C.S.; VILLEGAS, P.; KLEVEN, S.H. Field trials with an oil emulsion Newcastle disease vaccine in broiler breeders. *Poultry Science*, vol. 59, p.702-707, 1980.

GARCIA, K.O.; BERCHIERI – JUNIOR, A.; SANTANA, A.M.; FREITAS-NETO, O.C.; FAGLIARI, J.J. Experimental infection of commercial layers using a *Salmonella enterica* serovar *gallinarum* strain: Leukogram and serum acute-phase protein concentrations, *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, vol.11, n.4, p.263-270, 2009.

GLASS, F.J.; SUSAN C. CRAIGMILE, S.C.; SPRINGBETT, A.; , PRESTON, P.M.; KIRVAR, E.; WILKIE, G.M.; ECKERSALL, P.D.; HALL, F.R.; BROWN, C.G.D. The protozoan parasite, *Theileria annulata*, induces a distinct acute phase protein response in cattle that is associated with pathology. *International Journal for Parasitology*, vol.33, p.1409–1418, 2003.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M.J.M.; NIEWOLD, T.A.; KOOPMANS, S.J. Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University Science*, vol.6B, p.1045–1056, 2005.

HULTEN, C.; SANDGREN, B.; SKIOLDEBRAND, E.; KLINGEBORN, B.; MARHAUG, G.; FORSBERG, M. The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker in equine influenza virus infection. *Acta Vet Scand*, vol.40, p.323-333, 1999.

ICVT- The *international Committee on Taxonomy of viruses*. Disponível em:< <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2012>. Acesso em: 18 fev. 2013.

LUMEIJ, J.T. Avian Clinical Biochemistry. In: KANEKO J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5th ed., San Diego Academic Press, 1997. 932p.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal*, vol.168, p. 28–40, 2004.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. *Nutrient requirements of poultry*. 9 ed. Washington: National Academy of Sciences, 1994.

PAULILLO, A. C. *Doença de Newcastle: estudo experimental da resposta imune às estirpes vacinais B1 e LaSota*. 1980. 84f. Dissertação (Mestrado)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PAULILLO, A. C. *Estudo experimental da resposta imunitária às vacinas inativada (oleosa) e viva (amostra LaSota) contra a doença de Newcastle*. 1984. 129f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PAULILLO, A.C. *Avaliação da resposta imune e da performance zootécnica de poedeiras vacinadas experimentalmente contra a doença de Newcastle*. 1988. 116f. Tese (Livre Docência em Ornitopatologia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1988.

PAULILLO, A.C.; DORETTO JÚNIOR, L. Doença de Newcastle. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. (Eds.) *Doenças das aves*, 2 ed. Campinas: FACTA, 2009. p. 587-608.

PAULILLO, A. C.; MONTASSIER, H. J.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; ARIKI, J.; RICHTZENHAIN, L.J.; NAKAGHI, L. S. O.; BARBOSA, J. C.; QUINTANA, J. L. Doença de Newcastle. IV. Ensaio experimental de diferentes vias de vacinação com a estirpe lentogênica LaSota em frangos de corte. *Ars Veterinária*, Jaboticabal, v.3, n.1, p.73-79, 1987.

PAULILLO, A.C.; PINTO, A. A.; ARIKI, J.; BERCHIERI JÚNIOR, A. Doença de Newcastle. I . Estudo experimental da resposta imune às estirpes vacinais B1 e LaSota. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/ Universidade São Paulo*, São Paulo, v.19, n.1, p.9-43, 1982.

PAULILLO, A. C.; SILVA, G. S.; DORETTO JUNIOR, L.; MEIRELES, M. V.; KRONKA, S. N.; ARIKI, J.; SAKOMURA, N. K.; RIBEIRO, R. C. Estudos zootécnico e imunológico de aves de corte submetidas a diferentes programas de vacinação contra a doença de Newcastle In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECHNIA 33, 1996, Fortaleza, *Anais...* Fortaleza: SBZ, 1996. p.388-390.

POLAT, U.; CETIN, M.; BALCI, F. Detection of serum protein fractions and their concentrations in laying and non-laying ostriches (*Struthio camelus*) fed with different dietary protein levels. *Revue Méd. Vét*, vol.155, n.11, p.570-574, 2004.

PETERSEN, H.H.; NIELSEN, J.P.; HEEGAARD, P.M. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research*, vol.35, p.163-187, 2004.

RATH, N.C.; ANTHONY, N.B.; KANNAN, L.; HUFF, W.E.; HUFF, G.R.; CHAPMAN, H.D.; ERF, G.F.; WAKENELL, P. Serum ovotransferrin as a biomarker of inflammatory diseases in chickens. *Poultry Science*, Vol.88, p. 2069-2074, 2009.

SCHMIDT, E.M.S.; PAULILLO, A.C.; MARTINS, G.R.V., DENADAI, J., LAPERA, I.M., Immunological and Clinical Parameters of Newcastle Disease Vaccination in Bronze Turkeys(MELEAGRIS Gallopavo) . *International Journal of Poultry Science* 9 (2), p 180-182, 2010.

SCHMIDT, E.M.S.; PAULILLO, A.C.; FAGLIARI, J.J. Serum ovotransferrin in broiler chickens. In World's Poultry Congress, 2012, Salvador, Brazil. *World's Poultry Science Journal*, s. 1.

SCHMIDT, U.; Infecções por Paramixovirus. In: BEER, J. *Doenças Infecciosas em Animais Domésticos*. São Paulo: Roca, 1999. p. 132-139.

SYLTE, M.J.; SUAREZ, D.L. Vaccination and acute phase mediator production in chickens challenged with low pathogenic avian influenza virus; novel markers for vaccine efficacy? *Vaccine* 30, p 3097-3105. 2012.

STELL, R.G.D.; TORRIE, J.H. Principles and procedures of statistics. 2thed. New York: McGraw-Hill Book, 1980. 633p.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT M.A. Proteínas. In: *Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária*. 2^a Ed. Guanabara Koogan, 2011. p.303-341.

SWAYNE, D.E.; KING, D.J. Avian influenza and Newcastle disease. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, v.222, n.11, p.1534-1540, 2003.

TILLET, W.S.; FRANCIS, T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of *Pneumococcus*. *J Exp Med*. Vol.52, p.561–571. 1930. Download de: jem.rupress.org em 25 de agosto de 2012.

WARDEN, D.; FURMINGER, I.G.S. AND W.W. ROBERTSON. Immunising chicks against Newcastle disease by concurrent inactivated oil-emulsion and live B1 vaccines. *Veterinary Record*, 96(3), p.65-66, 1975.

WEBER, K.; OSBORN, M. The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *The journal of chemistry*, vol. 244, No. 16, p. 4406-4412, 1969.

WICHER, K.B.; FRIES, E. Haptoglobin, a hemoglobin-binding plasma protein, is present in bony fish and mammals but not in frog and chicken. *PNAS* vol.103, p.4168-4173, 2006.

WICHER K. B., FRIES E. Evolutionary Aspects of Hemoglobin Scavengers. *Antioxidants & Redox Signaling*, vol.12, p. 249-259, 2010.

WINTERFIELD, R.W.; GOLDMAN, C.L.; SEADALE, E.H. Newcastle disease immunization studies: vaccination of chickens with B1, F and LaSota strains of Newcastle disease virus administered through the drinking water. *Poultry Science*, Champaign, v.36, p. 1076-1088, 1957.

WINTERFIELD, R. W., FADLY, A. M. Vaccination of Turkeys against Newcastle Disease. *Avian Diseases*, Vol. 17, No. 1, p. 42-48. 1972.

THE WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH- WOA – Disponível em : <<http://oie.int/>>. Acesso em: 25 jul. 2012.

XIE, H.; HUFF, G.R.; HUFF, W.E.; BALOG, J.M.; HOLT, P.; RATH, N.C.
Identification of ovotransferrin as an acute phase protein in chickens. *Poultry Science*, Vol.81, p. 112-120, 2002.

8. ARTIGO CIENTÍFICO

O manuscrito está de acordo com as normas da revista “*CIÊNCIA RURAL*”

ELETROFORETOGRAMA DE PROTEÍNAS DE PERUS (*Meleagris gallopavo*) VACINADAS CONTRA DOENÇA DE NEWCASTLE DURANTE O PERÍODO DE POSTURA.

(ELECTROPHORETOGRAM OF PROTEINS IN EGG-LAYING TURKEYS (*Meleagris gallopavo*) VACCINATED AGAINST NEWCASTLE DISEASE)

**J. R. W. BRANCHER^{1*}, E. M. S. SCHMIDT², J. DENDAI³, A. C. PAULILLO⁴, J. J.
FAGLIARI⁵**

**Eletroforetograma de proteínas de perus (*Meleagris gallopavo*) vacinadas contra
doença de Newcastle durante o período de postura**

**Electrophoretogram of proteins in egg-laying turkeys (*Meleagris gallopavo*)
vaccinated against Newcastle disease**

RESUMO

O principal objetivo desta pesquisa foi demonstrar como o perfil das proteínas de fase aguda podem servir de ferramenta para monitorar a eficácia da vacinação contra a doença de Newcastle, utilizando-se as cepas LaSota ativada e inativada em perus fêmeas em fase de produção ao se comparar com um grupo controle não vacinado. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) para as concentrações das proteínas totais, de alfa-1 glicoproteína ácida, IgG de cadeia pesada e leve, e da ovotransferrina, entre os grupos, nos diferentes momentos avaliados. A fração de ovotransferrina, de 80kD, foi identificada em todas as aves e em todos os momentos investigados. A eletroforese de proteínas séricas foi útil verificar a eficácia do programa de vacinação contra a doença de Newcastle nas 36^a, 38^a, 46^a, 48^a e 52^a semanas de idade de perus fêmeas em fase de produção.

PALAVRAS-CHAVE: Doença de Newcastle. Proteínas de Fase Aguda. Peru. Vacinação

SUMMARY

The main objective of this research was to demonstrate how the acute phase proteins profile may serve as a tool to monitor the effectiveness of vaccination against Newcastle disease using the activated and LaSota inactivated strains in female egg-laying- turkeys when compared with a unvaccinated control group. Significant differences were observed ($p < 0.05$) for total serum proteins, alpha-1 acid glycoprotein, IgG heavy and light chain, and ovotransferin between the e groups and moments evaluated. The ovotransferrin fraction showed a molecular weight of 80kD for all the birds evaluated. The electrophoresis of serum proteins can serve as a tool to

verify the effectiveness of the vaccination program on 36th, 38th, 46th, 48th and 52th weeks old female egg-laying- turkeys.

KEY WORDS: Newcastle disease. Acute phase proteins. Turkey. Vaccination

INTRODUÇÃO

O peru (*Meleagris gallopavo*, Linnaeus, 1758, Galliformes, *Phasianidae*), é uma ave originária da América do Norte, com elevado potencial zootécnico (BRANT, 1998). Segundo Alexander (2009), mais de 250 espécies de aves são suscetíveis à infecção pelo vírus da doença de Newcastle, que é causada por Paramyxovirus aviário tipo 1 (APMV-1), do gênero *Avulavirus* (ICTV, 2012). Para o controle desta enfermidade, além das medidas de biossegurança, a vacinação é um método eficiente (PAULILLO & DORETTO JÚNIOR, 2009).

As proteínas de fase aguda são sintetizadas principalmente nos hepatócitos, induzidas por citocinas pró-inflamatórias, tais como Interleucinas IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (ECKERSALL, 2008; GRUYS et al., 2005 MURATA et al., 2004).

O principal propósito desta investigação foi demonstrar como o perfil das proteínas de fase aguda podem servir de ferramenta para monitorar a eficácia da vacinação contra a DN, utilizando-se as cepas LaSota ativada e inativada em perus em fase de produção ao se comparar com um grupo controle não vacinado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As aves foram alojadas em um galpão de alvenaria permanecendo 15 animais por boxe de galpão, totalizando 45 perus fêmeas, da linhagem Bronze. Foram realizadas 11 colheitas de sangue, a partir da 32^a semana de idade das aves, com intervalos regulares de 14. Os soros obtidos foram inativados a 56° C por 30 minutos e congelados a -20° C até o momento do uso.

Utilizaram-se vacinas vivas atenuadas provenientes de um mesmo laboratório de frascos de única partida, estando todos no início de validade. Utilizou-se a vacina (oleosa) preparada com a estirpe lentogênica LaSota, inativada e emulsionada em óleo mineral. A

vacinação, com esta cepa, foi realizada na região cervical dos perus por via subcutânea. Para a outra vacina (liofilizada), preparada com estirpe vacinal LaSota ativada, realizou-se a vacinação via ocular, utilizando-se diluente fornecido pelo fabricante na proporção de 30mL/1000 doses vacinais/1000 aves.

O antígeno usado na reação de inibição da hemaglutinação foi a estirpe lentogênica LaSota do vírus da DN, mantido em laboratório por passagens sucessivas em líquido alantoide de embrião de galinha SPF, com oito a 10 dias de desenvolvimento. Para esta reação, foi empregado o método β , utilizando-se a microtécnica, padronizada por CUNNINGHAM (1971). O título foi expresso mediante a multiplicação do número de UHA utilizadas pela recíproca da maior diluição do soro que inibe completamente a hemaglutinação e transformados em log de base 2.

Para o fracionamento das proteínas séricas utilizou-se o gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), proposto por WEBER E OSBORN (1969). Após o fracionamento, o gel foi corado durante 10 minutos em solução de Coomassie Blue 0,25% e, posteriormente, foi colocado em solução de ácido acético 7% para retirar o excesso do corante. Para a identificação das proteínas, foi utilizada uma solução marcadora de referência (Sigma® S8445, St. Louis, EUA) com diferentes pesos moleculares de 20 kilodáltons (20kD), 24 kD, 29 kD, 45 kD, 55 kD, 66 kD, 97 kD, 116 kD e 200 kD e por comparação pela mobilidade eletroforética da albumina purificada, IgG, haptoglobina, transferrina, ceruloplasmina e alfa-1 antitripsina (Sigma® S8445, St. Louis, EUA). Os pesos moleculares e as concentrações das frações proteicas foram determinados em videodensitômetro computadorizado (Shimadzu® CS9301, Tóquio, Japão).

As concentrações das proteínas séricas totais foram determinadas pela reação do biureto, utilizando-se kit bioquímico comercial (Labtest®) e leitura em espectofotômetro automático (Cobas Roche®). As concentrações de ovotransferrina foram determinadas

utilizando-se ovotransferrina purificada de galinha livre de ferro (Sigma-Aldrich® St. Louis, MO, EUA), pela técnica de (SDS-PAGE), corado com azul de Coomassie 0,25%.

Os dados do perfil eletroforético das proteínas foram analisados pelo ANOVA e aqueles com diferença significativa foram submetidos ao Teste de Tukey com 0,05% de significância ($p < 0,05$) (Statview® 5.0). Na verificação do grau de imunidade pós-vacinal, foi aplicado um modelo de análise de variância descrito por Stell & Torrie (1980). Nos casos em que foram constatadas diferenças significativas, foram executados contrastes, pelo Teste de Tukey, com 5% de probabilidade.

5 RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta as médias geométricas dos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação (HI) ($\log_2$) dos soros das fêmeas de perus (*Meleagris gallopavo*) submetidas a vacinação contra a DN. As Tabelas 2 a 5 apresentam os resultados das concentrações séricas das proteínas totais e suas frações: IgA, ceruloplasmina, transferrina, ovotransferrina, albumina, IgG de cadeia pesada, haptoglobina/PIT 54, alfa-1 glicoproteína ácida, IgG de cadeia leve e uma proteína não identificada nominalmente com peso molecular de 23kDa, dos perus na fase de produção entre 32 e 52 semanas de idade vacinadas ou não contra a doença de Newcastle.

DISCUSSÃO

Os dois lotes de perus que receberam vacinas, em processo de vacinação e revacinação contra DN, em linhas gerais, responderam ao estímulo antigênico, produzindo títulos de anticorpos aferidos pelo HI. Analisando a Tabela 1, os títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação obtidos na imunização com vacina a vírus inativado em excipiente oleoso, foram elevados e superiores do que aqueles obtidos pela imunização com vacina a vírus vivo. Esses resultados corroboram com os achados experimentais de EIDSON et al. (1980) e PAULILLO (1988). De acordo com WARDEN et al. (1975), os

adjuvantes oleosos formam uma emulsão estável e difícil de se romper, da qual o antígeno é liberado lentamente, observando-se assim um estímulo prolongado do sistema imune o que determina uma resposta mais intensa e de maior duração.

Na 36^a semana, quatro semanas após a vacinação, observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) para as concentrações da alfa-1 glicoproteína ácida (Tabela 4) entre o grupo vacinado com a cepa LaSota inativada e o grupo vacinado com a cepa LaSota ativada. Nesta mesma semana, os títulos obtidos pelo HI (Tabela 1), foram maiores para o grupo vacinado com a cepa LaSota inativada. A alfa-1 glicoproteína ácida é uma proteína com função imunorreguladora, pois inibe a ativação dos neutrófilos e o aumento da secreção de IL-1 (MURATA et al., 2004; CHAMANZA et al., 1999). Sugere-se que a alfa-1 glicoproteína ácida tenha-se apresentado como uma PFA negativa em relação à resposta imune vacinal com a cepa LaSota inativada, uma vez que, apesar do elevado título de anticorpos, houve diminuição significativa ($p < 0,05$) nas concentrações desta proteína. Esses achados corroboram com os obtidos por SYLTE & SUAREZ (2012), que observaram que em um grupo de frangos com quatro semanas de idade, vacinados contra o vírus da influenza aviária, as concentrações séricas de alfa-1 glicoproteína ácida foram significativamente inferiores quando comparados com o grupo controle.

Na 38^a semana, seis semanas após a vacinação, observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) para as concentrações de IgG cadeia pesada (Tabela 4) entre o grupo vacinado com a cepa LaSota inativada e o grupo vacinado com a cepa LaSota ativada, sendo a maior concentração desta proteína observada no grupo vacinado com a cepa ativada. Esse resultado era esperado, pois o aumento das concentrações de IgG refletem a reação imunológica causada pela vacina (ECKERSALL, 2008). Na 46^a semana, as concentrações de proteínas totais (Tabela 3) apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) entre o grupo vacinado com a cepa LaSota inativada e o grupo controle. Neste mesmo momento, os

títulos obtidos do HI (Tabela 1) foram maiores no grupo vacinado com a cepa LaSota inativada. Assim, pode-se supor que a vacinação contra a doença de Newcastle utilizando-se a cepa LaSota inativada, foi responsável pela elevação das concentrações das proteínas séricas totais (Tabela 3) causada pelo aumento das concentrações das IgG de cadeia leve e pesada (Tabela 5), pois as concentrações de globulinas geralmente estão elevadas em condições de estímulo antigênico (LUMEIJ, 1997). Esses resultados são compatíveis com o grande potencial de difusão da estirpe LaSota (WINTERFIELD et al., 1957). Na 48ª semana foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) para as concentrações da ovotransferrina (Tabela 3) entre o grupo vacinado com a cepa LaSota ativada e o grupo vacinado com a cepa LaSota inativada, sendo a maior concentração observada neste grupo. Este resultado corrobora com os dados de RATH et al. (2009), que observaram aumento da concentração sérica da ovotransferrina em aves expostas a bactérias, vírus ou inflamação por indução química, sugerindo que a ovotransferrina seja uma proteína de fase aguda positiva nas aves. O peso molecular da ovotransferrina encontrada nos perus fêmeas do presente estudo foi de 80kD. Por outro lado, XIE et al. (2002) caracterizaram como ovotransferrina uma proteína com peso molecular de 65kD em frangos de corte com quatro semanas de idade. SCHMIDT et al. (2012) caracterizaram uma proteína com peso molecular de 72kD para frangos de corte de oito dias de idade, 71kD aos 18 dias de idade e 70kD aos 37 dias de idade, como sendo a ovotransferrina.

A albumina (Tabela 3) apresentou aumento em suas concentrações séricas em todos os grupos avaliados, mas não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos. Os aumentos das concentrações séricas de ovotransferrina e da albumina não coincidem com os resultados obtidos por XIE et al. (2002), que demonstraram elevações nas concentrações séricas de ovotransferrina, e em contrapartida, a diminuição das concentrações séricas de albumina em frangos de corte com quatro semanas de idade. Neste mesmo momento, ou

seja, na 48ª semana (Tabela 5), as concentrações séricas da IgG de cadeia leve apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo vacinado com a cepa LaSota inativada em relação ao grupo controle. Assim, pode-se supor que a vacinação contra a doença de Newcastle utilizando-se a cepa LaSota inativada foi responsável pela elevação das concentrações desta imunoglobulina (LUMEIJ, 1997).

Na 52ª semana, houve diferença significativa ($p < 0,05$) para as concentrações da alfa-1 glicoproteína ácida (Tabela 5) entre o grupo controle e o grupo vacinado com cepa LaSota inativada, que apresentou elevada concentração desta proteína. Diferentemente do que ocorreu na 36ª semana, quando o grupo vacinado com a cepa LaSota inativada apresentou menor concentração em relação ao grupo vacinado com a cepa LaSota ativada. Os resultados encontrados para o HI (Tabela 1) das aves vacinadas com a cepa LaSota inativada foram também significativamente ($p < 0,05$) superiores em relação ao grupo vacinado com a cepa ativada. Este fato pode ser explicado pela função da alfa-1 glicoproteína ácida. Ou seja, seu papel imunorregulador (MURATA et al., 2004; CHAMANZA et al., 1999) evidencia que a cepa LaSota inativada apresentou melhor eficiência na produção de anticorpos e, conseqüentemente, resposta imunológica mais efetiva.

6 CONCLUSÃO

A fração de ovotransferrina, de 80kD, foi identificada em todas as aves avaliadas.

A eletroforese de proteínas séricas pela técnica de SDS-PAGE foi útil para verificar a eficácia do programa de vacinação nas 36ª, 38ª, 46ª, 48ª e 52ª semanas de idade de perus fêmeas em fase de produção.

Protocolo da Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA) Unesp- 102/2011.

Tabela 2 – Concentração (médias $\pm$ desvio padrão) das proteínas séricas totais (g/dL) e das frações proteicas (mg/dL) IgA, ceruloplasmina transferrina, ovotransferrina e albumina (g/dL) de perus em fase de produção, entre 32 e 40 semanas de idade (n=45)

		SEMANAS				
		32	34	36	38	40
Proteína total		4,22	4,92	4,3	4,86	5,45
	C	$\pm 1,00$	$\pm 1,2$	$\pm 0,88$	$\pm 0,17$	$\pm 0,57$
		5,7	5,43	5,56	4,97	5,51
	I	$\pm 1,60$	$\pm 1,3$	$\pm 0,19$	$\pm 0,73$	$\pm 0,55$
		4,62	4,87	4,96	5,38	5,41
	A	$\pm 0,72$	$\pm 0,2$	$\pm 0,68$	$\pm 0,73$	$\pm 0,86$
IgA		38,13	63,45	64,84	59,05	45,19
	C	$\pm 24,41$	$\pm 18,3$	$\pm 17,9$	$\pm 27,79$	$\pm 19,13$
		65,85	62,78	68,76	71,84	48,26
	I	$\pm 14,61$	$\pm 27,1$	$\pm 17,22$	$\pm 20,05$	$\pm 17,57$
		50,08	65,66	49,09	67,24	60,92
	A	$\pm 20,9$	$\pm 8,4$	$\pm 24,47$	$\pm 15,53$	$\pm 33,54$
Ceruloplasmina		22,61	27,82	20,55	20,17	25,77
	C	$\pm 11,95$	$\pm 8,4$	$\pm 11,9$	$\pm 5,98$	$\pm 9,23$
		26,57	34,88	21,86	24,37	33,5
	I	$\pm 9,19$	$\pm 9,8$	$\pm 7,18$	$\pm 4,04$	$\pm 19,74$
		15,6	29,8	19,76	21,72	86,47
	A	$\pm 4,86$	$\pm 2,7$	$\pm 4,97$	$\pm 6,67$	$\pm 88,31$
Transferrina		50,57	110,9	46,76	48,85	31,09
	C	$\pm 22,2$	$\pm 62,8$	$\pm 12,7$	$\pm 6,0$	$\pm 16,6$
		43,51	125,7	44,49	40,37	47
	I	$\pm 8,2$	$\pm 112,7$	$\pm 16,5$	$\pm 19,07$	$\pm 27,58$
		39,67	41,14	48,91	35,99	20,97
	A	$\pm 24,09$	$\pm 25,33$	$\pm 28,4$	$\pm 16,29$	$\pm 9,77$
Ovotransferrina		572,83	393,7	574,3	453,24	495,72
	C	$\pm 242,7$	$\pm 260,0$	$\pm 298,7$	$\pm 128,96$	$\pm 260,6$
		482,45	415,3	321,3	618,19	341,56
	I	$\pm 302,17$	$\pm 252,9$	$\pm 74,5$	$\pm 364,12$	$\pm 59,28$
		645,47	567,8	457,49	579,92	482,29
	A	$\pm 277,25$	$\pm 250,2$	$\pm 254,4$	$\pm 363,73$	$\pm 146,55$
Albumina		2,3	3,05	2,28	2,97	2,97
	C	$\pm 0,63$	$\pm 0,77$	$\pm 0,64$	$\pm 0,26$	$\pm 0,52$
		3,01	2,76	2,74	2,81	30,6
	I	$\pm 1,2$	$\pm 0,43$	$\pm 0,26$	$\pm 0,42$	$\pm 0,39$
		2,4	2,41	2,61	30,09	2,97
	A	$\pm 0,8$	$\pm 0,29$	$\pm 0,19$	$\pm 0,3$	$\pm 0,6$

C grupo controle; I grupo vacinado cepa LaSota inativada; A grupo vacinado cepa LaSota ativada. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

Tabela 3 – Concentração (médias $\pm$ desvio padrão) das proteínas séricas totais (g/dL) e das frações proteicas (mg/dL) IgA, ceruloplasmina transferrina, ovotransferrina e albumina (g/dL) de perus em fase de produção, entre 42 e 52 semanas de idade (n=45)

		SEMANAS					
		42	44	46	48	50	52
Proteína total		6	5,16	5,19	6,04	5,38	6,49
	C	$\pm 0,9$	$\pm 1,05$	$\pm 0,76\mathbf{a}$	$\pm 0,75$	$\pm 0,91$	$\pm 0,58$
		5,47	5,56	6,91	6,46	5,6	6,65
	I	$\pm 0,7$	$\pm 1,25$	$\pm 1,2\mathbf{b}$	$\pm 1,2$	$\pm 0,32$	$\pm 0,95$
		6,07	5,82	5,88	5,18	5,84	6,3
	A	$\pm 1,0$	$\pm 0,74$	$\pm 0,84\mathbf{ab}$	$\pm 0,8$	$\pm 1,00$	$\pm 0,9$
IgA		73,9	44,87	56,47	66,74	48,71	63,19
	C	$\pm 27,2$	$\pm 34,01$	$\pm 32,4$	$\pm 23,7$	$\pm 23,08$	$\pm 27,46$
		81,9	47,78	68,35	40,03	68,54	91,97
	I	$\pm 12,0$	$\pm 22,28$	$\pm 38,64$	$\pm 23,3$	$\pm 33,19$	$\pm 47,02$
		66,37	55,12	47,75	50,43	33,62	50
	A	$\pm 19,4$	$\pm 20,0$	$\pm 29,05$	$\pm 37,6$	$\pm 22,51$	$\pm 29,00$
Ceruloplasmina		34,9	24,69	29,61	47,18	30,85	37,42
	C	$\pm 12,5$	$\pm 14,63$	$\pm 10,0$	$\pm 27,8$	$\pm 11,85$	$\pm 15,8$
		63,8	25,05	37,4	32,03	41,56	30,8
	I	$\pm 82,6$	$\pm 7,46$	$\pm 11,2$	$\pm 23,2$	$\pm 35,96$	$\pm 10,4$
		37,3	35,21	33,98	29,74	29,59	54,7
	A	$\pm 6,9$	$\pm 15,0$	$\pm 14,9$	$\pm 15,6$	$\pm 34,29$	$\pm 27,5$
Transferrina		42,94	44,41	35,21	81,3	110,05	75,58
	C	$\pm 36,7$	$\pm 23,13$	$\pm 16,2$	$\pm 64,6$	$\pm 54,49$	$\pm 31,1$
		31,92	41,84	112,05	137,76	105,12	160,85
	I	$\pm 19,86$	$\pm 14,2$	$\pm 155,5$	$\pm 70,7$	$\pm 61,78$	$\pm 78,68$
		50,14	54,3	45,04	57,08	85,42	92,36
	A	$\pm 36,10$	$\pm 62,2$	$\pm 18,08$	$\pm 30,2$	$\pm 44,5$	$\pm 67,9$
Ovotransferrina		463,4	431,43	402,8	768,9	827,03	742,23
	C	$\pm 75,8$	$\pm 158,2$	$\pm 105,6$	$\pm 296,8\mathbf{ab}$	$\pm 243,3$	$\pm 284,96$
		515,6	497,22	722,04	1040,8	822,23	558,17
	I	$\pm 284,9$	$\pm 210,7$	$\pm 289,34$	$\pm 258,3\mathbf{a}$	$\pm 300,44$	$\pm 112,17$
		669	435,81	576,43	549,45	881,68	612,1
	A	$\pm 240,2$	$\pm 154,0$	$\pm 248,8$	$\pm 172,8\mathbf{b}$	$\pm 268,55$	$\pm 277,48$
Albumina		3,2	2,6	2,81	3,48	3,04	3,61
	C	$\pm 0,55$	$\pm 0,43$	$\pm 0,6$	$\pm 0,6\mathbf{a}$	$\pm 0,41$	$\pm 0,49$
		3,26	2,8	3,6	3,43	3,29	3,25
	I	$\pm 0,37$	$\pm 0,59$	$\pm 0,73$	$\pm 0,5\mathbf{a}$	$\pm 0,24$	$\pm 0,26$
		3,29	2,97	2,88	2,5	3,31	3,22
	A	$\pm 0,46$	$\pm 0,35$	$\pm 0,79$	$\pm 0,5\mathbf{a}$	$\pm 0,33$	$\pm 0,36$

C grupo controle; I grupo vacinado cepa LaSota inativada; A grupo vacinado cepa LaSota ativada. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

Tabela 4 – Concentração (médias $\pm$ desvio padrão) das frações proteicas (mg/dL), IgG de cadeia pesada, haptoglobina/PIT 54 e alfa-1 glicoproteína ácida, IgG de cadeia leve e PM 23kDa de perus em fase de produção, entre 32 e 40 semanas de idade (n=45)

		SEMANAS				
		32	34	36	38	40
IgG cadeia pesada		73,65	51,62	119,73	61,01	63,88
	C	$\pm 48,69$	$\pm 63,75$	$\pm 79,21$	$\pm 32,8ac$	$\pm 42,63$
		29,24	70,06	53,13	54,3	109,51
	I	$\pm 21,98$	$\pm 58,03$	$\pm 35,6$	$\pm 30,29a$	$\pm 29,3$
		55,82	109,51	87,76	126,81	96,64
	A	$\pm 44,31$	$\pm 18,74$	$\pm 47,1$	$\pm 72,2bc$	$\pm 62,63$
Haptoglobina/ PIT 54		15,72	14,89	26,18	20,64	33,37
	C	$\pm 9,55$	$\pm 4,17$	$\pm 6,95$	$\pm 6,3$	$\pm 9,98$
		16,43	27,48	19,65	23,42	33,12
	I	$\pm 5,9$	$\pm 16,5$	$\pm 7,58$	$\pm 10,4$	$\pm 10,74$
		21,5	21,8	24,12	19,95	22,76
	A	$\pm 15,9$	$\pm 4,1$	$\pm 5,72$	$\pm 7,3$	$\pm 10,19$
Alfa-1 glicoproteína ácida		14,34	18,73	20,49	16,23	27,11
	C	$\pm 7,0$	$\pm 9,25$	$\pm 4,25ac$	$\pm 4,9$	$\pm 9,8$
		16,83	23,37	15,49	24,59	30,01
	I	$\pm 7,0$	$\pm 13,7$	$\pm 4,26a$	$\pm 17,4$	$\pm 7,78$
		13,53	19,83	23,16	17,18	33,1
	A	$\pm 7,2$	$\pm 5,78$	$\pm 4,22bc$	$\pm 6,09$	$\pm 15,22$
IgG cadeia leve		163,25	160,58	204,99	155,05	279,18
	C	$\pm 131,8$	$\pm 98,6$	$\pm 118,62$	$\pm 18,52$	$\pm 119,93$
		134,3	173,55	171,8	174,15	310,5
	I	$\pm 66,2$	$\pm 115,6$	$\pm 43,59$	$\pm 79,1$	$\pm 155,63$
		168,7	135,22	281,94	191,9	284,09
	A	$\pm 75,9$	$\pm 37,6$	$\pm 181,66$	$\pm 116,3$	$\pm 126,02$
PM23.kDa		471	480,61	380,7	614,97	538,2
	C	$\pm 170,8$	$\pm 141,8$	$\pm 123,0$	$\pm 28,31$	$\pm 186,94$
		698,4	711,62	571,1	527,2	523,59
	I	$\pm 152,8$	$\pm 232,2$	$\pm 113,0$	$\pm 164,20$	$\pm 265,86$
		555,1	567,9	477,7	583,94	400,39
	A	$\pm 179,5$	$\pm 115,6$	$\pm 187,8$	$\pm 238,67$	$\pm 229,33$

C grupo controle; I grupo vacinado cepa LaSota inativada; A grupo vacinado cepa LaSota ativada. Letras diferentes mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

na

Tabela 5 – Concentração (médias $\pm$ desvio padrão) das frações proteicas (mg/dL) IgG de cadeia pesada, haptoglobina/PIT 54 e alfa-1 glicoproteína ácida, IgG de cadeia leve e PM 23kDa de perus em fase de produção, entre 42 e 52 semanas de idade (n=45)

		SEMANAS					
		42	44	46	48	50	52
IgG cadeia pesada		150,26	88	102	161,94	123,26	149,34
	C	$\pm 83,1$	$\pm 47,6$	$\pm 19,7$	$\pm 29,92$	$\pm 17,6$	$\pm 31,62$
		101,23	123,43	171,12	144,36	80,18	167,07
	I	$\pm 36,1$	$\pm 26,1$	$\pm 58,8$	$\pm 59,73$	$\pm 61,4$	$\pm 125,7$
		136,54	78,7	169,9	140,42	145,86	261,7
	A	$\pm 14,0$	$\pm 32,0$	$\pm 94,3$	$\pm 46,6$	$\pm 78,04$	$\pm 120,1$
Haptoglobina/ PIT 54		32,16	33,65	46,1	46,64	30,32	53,2
	C	$\pm 7,38$	$\pm 15,1$	$\pm 19,8$	$\pm 18,4$	$\pm 11,65$	$\pm 20,33$
		31,89	42,62	50,84	41,11	26,52	40,06
	I	$\pm 11,75$	$\pm 9,4$	$\pm 26,5$	$\pm 10,7$	$\pm 9,81$	$\pm 6,29$
		34,51	42,16	40,6	38,31	31	42,32
	A	$\pm 5,6$	$\pm 10,8$	$\pm 9,9$	$\pm 22,6$	$\pm 18,56$	$\pm 6,49$
Alfa-1 glicoproteína ácida		26,9	39,08	26,15	28,08	28,9	24,43
	C	$\pm 14,0$	$\pm 15,1$	$\pm 5,7$	$\pm 7,25$	$\pm 8,18$	$\pm 3,86a$
		28,79	25,37	40,71	22,49	24,96	42,66
	I	$\pm 5,79$	$\pm 6,45$	$\pm 26,4$	$\pm 12,5$	$\pm 9,82$	$\pm 14,84b$
		31,69	45,07	33,8	23,84	26,68	32,57
	A	$\pm 8,77$	$\pm 44,08$	$\pm 8,5$	$\pm 12,45$	$\pm 12,96$	$\pm 14,15ab$
IgG cadeia leve		281,38	421,2	390,5	324,48	435,17	491,94
	C	$\pm 87,8$	$\pm 236,2$	$\pm 190,8$	$\pm 71,7ac$	$\pm 245,26$	$\pm 311,8$
		206,21	630,5	588,8	696	353,13	804,06
	I	$\pm 65,2$	$\pm 475,1$	$\pm 345,7$	$\pm 345,6b$	$\pm 74,2$	$\pm 471,56$
		312,4	349,09	485,9	592,12	549,49	488,83
	A	$\pm 174,0$	$\pm 156,63$	$\pm 133,4$	$\pm 153,9bc$	$\pm 378,41$	$\pm 195,39$
PM23kDa		660,32	287,19	281,8	280,85	224,31	262,14
	C	$\pm 243,8$	$\pm 125,36$	$\pm 138,5$	$\pm 172,4$	$\pm 104,27$	$\pm 146,54$
		522,96	229,3	273,1	209,9	155,89	226,6
	I	$\pm 118,97$	$\pm 125,7$	$\pm 174,9$	± 188	$\pm 108,49$	$\pm 101,68$
		510,18	366,2	201,4	166,7	197,36	171,19
	A	$\pm 271,4$	$\pm 164,5$	$\pm 61,4$	$\pm 75,74$	$\pm 113,6$	$\pm 46,54$

C grupo controle; I grupo vacinado cepa LaSota inativada; A grupo vacinado cepa LaSota ativada. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

REFERENCIAS

- ALEXANDER, D.J.; Doença de Newcastle. In REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária**. São Paulo: Manole, 2009. Cap.21, p 219-228.
- BRANT, A.W. **A brief history of the turkey**. **World's Poultry Science**, 54: 365-373, 1998. Disponível em:< <http://dx.doi.org/10.1079/WPS19980027>>. Acesso em: 12 fev. 2011. doi: 10.1079/WPS19980027.
- CAMPBELL, T.W. **Clinical Chemistry of Birds**. In THRALL, M.A. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2004. P. 479-492.
- CHAMANZA, R., van VEEN, L., TIVAPASI, M.T.; TOUSSAINT, M.J.M. **Acute phase proteins in the domestic fowl**. **Word's Poultry Science Journal**, vol.55, p.61-71, 1999. Acesso em: 21 mar. 2011. doi: 10.1079/WPS19990005.
- CUNNINGHAM, C. H. **Virologia practica**. 6. ed. Zaragoza: Acribia, 1971. 260p.
- ECKERSAL, P. D. **Proteins, Proteomics and the Dysproteinemias**. In: KANEKO J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 6ª ed., San Diego Academic Press, 2008. Cap. 5, p.117-155.
- EIDSON, C.S.; VILLEGAS, P.; KLEVEN, S.H. **Field trials with an oil emulsion Newcastle disease vaccine in broiler breeders**. **Poultry Science**, vol. 59, p.702-707, 1980. Disponível em: <http://ps.fass.org/content/59/4/702.full.pdf>. acesso em 09 mai 2012. doi: 10.3382/ps.0590702
- GRUYS, E.; TOUSSAINT, M.J.M.; NIEWOLD, T.A.; KOOPMANS, S.J. **Acute phase reaction and acute phase proteins**. **Journal of Zhejiang University Science**, vol.6B, p.1045–1056, 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1631/jzus.2005.B1045>. Acesso em: 04 abr 2011. doi: 10.1631/jzus.2005.B1045.

ICVT- The international Committee on Taxonomy of viruses. Disponível em: <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2012>. Acesso em: 18 fev. 2013.

LUMEIJ, J.T. **Avian Clinical Biochemistry.** In: KANEKO J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5th ed., San Diego Academic Press, 1997. 932p.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. **Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview.** *The Veterinary Journal*, vol.168, p. 28–40, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023303001199>>. Acesso em: 10 mai 2011. doi: 10.3382/ps.2009-00076.

PAULILLO, A.C. **Avaliação da resposta imune e da performance zootécnica de poedeiras vacinadas experimentalmente contra a doença de Newcastle.** 1988. 116f. Tese (Livre Docência em Ornitopatologia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1988.

PAULILLO, A.C.; DORETTO JÚNIOR, L. **Doença de Newcastle.** In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. (Eds.) *Doenças das aves*, 2 ed. Campinas: FACTA, 2009. p. 587-608.

RATH, N.C.; ANTHONY, N.B.; KANNAN, L.; HUFF, W.E.; HUFF, G.R.; CHAPMAN, H.D.; ERF, G.F.; WAKENELL, P. **Serum ovotransferrin as a biomarker of inflammatory diseases in chickens.** *Poultry Science*, Vol.88, p. 2069-2074, 2009. Disponível em: <http://ps.fass.org/content/88/10/2069.full?sid=40630970-21d5-468a-b3b6-8e6a00b216dd>. Acesso em 25 jun 2012. doi: 10.3382/ps.2009-00076.

SCHMIDT, E.M.S.; PAULILLO, A.C.; FAGLIARI, J.J. **Serum ovotransferrin in broiler chickens.** In *World's Poultry Congress, 2012, Salvador, Brazil*. *World's Poultry Science Journal*, s. 1.

SYLTE, M.J.; SUAREZ, D.L. **Vaccination and acute phase mediator production in chickens challenged with low pathogenic avian influenza virus; novel markers for vaccine efficacy?** *Vaccine*. 2012. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X12002496>> Acesso em 26 nov 2012. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.02.055.

STELL, R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics**. 2thed. New York: McGraw-Hill Book, 1980. 633p.

WARDEN, D.; FURMINGER, I.G.S. AND W.W. ROBERTSON. **Immunising chicks against Newcastle disease by concurrent inactivated oil-emulsion and live B1 vaccines**. *Veterinary Record*, 96(3), p.65-66, 1975.

WEBER, K.; OSBORN, M. **The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis**. *The journal of chemistry*, vol. 244, No. 16, p. 4406-4412, 1969. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/281/24/e19.full>. Acesso em: 02 mar 2012.

WINTERFIELD, R.W.; GOLDMAN, C.L.; SEADALE, E.H. **Newcastle disease immunization studies: vaccination of chickens with B1, F and LaSota strains of Newcastle disease virus administered through the drinking water**. *Poultry Science*, Champaign, v.36, p. 1076-1088, 1957. Disponível em: <http://ps.fass.org/content/36/5/1076.full.pdf> acesso em: 8 out 2012. doi:10.3382/ps.0361076.

XIE, H.; HUFF, G.R.; HUFF, W.E.; BALOG, J.M.; HOLT, P.; RATH, N.C. **Identification of ovotransferrin as an acute phase protein in chickens**. *Poultry Science*, Vol.81, p. 112-120, 2002.

ANEXO 1

A T E S T A D O

Atesto para os devidos fins, que o Projeto **"Eletroforetograma de proteínas de fêmeas perus (Meleagris gallopavo) da raça bronze durante o período de postura"**, Protocolo nº 102/2011-CEUA, de **Jonine Rayane Woitexen Brancher**, aluna do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, nível Mestrado, desta Faculdade, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 13 de maio de 2011.



Prof. Ass. Dr. Carlos Roberto Teixeira

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu