ATILIO SERSUN CALEFI

**Avaliação dos efeitos do estresse por calor sobre a imunidade
de frangos de corte em modelos experimentais de enterite necrótica
aviária**

São Paulo

2016

ATILIO SERSUN CALEFI

Avaliação dos efeitos do estresse por calor sobre a imunidade de frangos de corte em modelos experimentais de enterite necrótica aviária

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. João Palermo-Neto

São Paulo
2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3306 FMVZ	<p>Calefi, Atilio Sersun Avaliação dos efeitos do estresse por calor sobre a imunidade de frangos de corte em modelos experimentais de enterite necrótica aviária / Atilio Sersun Calefi. -- 2016. 255 f. il.</p> <p>Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2016.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.</p> <p>Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. João Palermo-Neto.</p> <p>1. Neuroimunomodulação. 2. Estresse por calor. 3. <i>Clostridium perfringens</i>. 4. <i>Eimeria</i> spp. 5. Monoaminas. I. Título.</p>
----------------	--

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação dos efeitos do estresse por calor em frangos de corte sobre a imunidade em um modelo experimental de enterite necrótica aviária", protocolado sob o nº3071/2013, utilizando 178 (cento e setenta e oito) aves, sob a responsabilidade Prof. Dr. João Palermo Neto, foi aprovado e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 9 de fevereiro de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CALEFI, Atilio Sersun

Título: Avaliação dos efeitos do estresse por calor sobre a imunidade de frangos de corte em modelos experimentais de enterite necrótica aviária

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Adriana e Valmir, pelo apoio durante todos os anos de estudo, empenho por contribuir com minha caminhada, amor e carinho por me trazer a esta existência.

A minha esposa Adriana, que todos esses anos esteve ao meu lado de forma ativa, dando todo suporte para a conclusão deste trabalho e me auxiliando em minha vida.

Aos meus irmãos, Renan e Marianna.

Aos meus avós Attilio, Maria, Raul e Linda.

A todos de minha família que me ajudaram a ser o que sou.

A minha amiga Wilma.

Aos que estiveram me apoiando em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. João Palemo Neto, que durante todos estes anos foi o meu mentor, que com muito zelo e atenção transmitiu seus conhecimentos visando sempre o melhor. Ao seu empenho e modelo de um Orientador legítimo do qual carregarei comigo.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), projetos de números 2009/51886-3, 2012/03103-2 e 2013/17408-2.

Conselho Nacional Brasileiro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), projetos de número 474690/2013-0.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Aos professores coordenadores da pós-graduação.

Ao Prof. Antonio José Ferreira Piantino que sempre esteve me auxiliando na condução e discussão deste trabalho.

A Profa. Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes que esteve ao meu lado auxiliando a construção deste trabalho e por muitas vezes discutiu nossos achados.

A Dra. Liliana del Carmen Revollo que desde meu mestrado auxiliou a moldar este trabalho.

A Dra. Claudete Astolfi Ferreira que me auxiliou por muitas vezes nas práticas laboratoriais e discussões sobre ornitopatologia.

Aos professores do grupo de Neuroimunomodulação que contribuíram com suas críticas para a construção deste trabalho.

Ao Wanderley que durante este período esteve auxiliando na construção de projetos e ajudando nas execuções experimentais.

A Juliana Garcia e Catarina que estiveram presentes auxiliando na construção deste trabalho.

Aos técnicos que estiveram dando todo suporte para que este trabalho fosse concluído: Nicolle, Herculano, Vagner, Luciano, Cláudio, Magali, Marguiti, Adriana, Dennis, Milena e Maurício.

Aos colegas que me auxiliaram nos diversos experimentos: Lilian, Daniel, Rafael, Fernanda, Carolina, Bruno, Anderlise, Daniel, Lucila, Ana Paula, Thiago M.

Aos colegas de pós-graduação por esses anos de convivência.

RESUMO

CALEFI, A. S. **Avaliação dos efeitos do estresse por calor sobre a imunidade de frangos de corte em modelos experimentais de enterite necrótica aviária.** [Effects of heat stress on immunity of broilers in experimental models of avian necrotic enteritis]. 2016. 255 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Doenças, como a enterite necrótica aviária (NE), têm se tornado reemergentes em função não apenas do sistema de criação intensivo de frangos de corte atualmente em uso, como também da restrição imposta ao uso dos aditivos antimicrobianos por diversos países, dentre os quais, aqueles da União Européia. A NE é uma doença que acomete aves de produção e seu agente etiológico primário é o *Clostridium perfringens* tipo A. Pouco se conhece a respeito dos mecanismos pelos quais o estresse modula o desenvolvimento da NE. O presente trabalho foi realizado para avaliar os efeitos do estresse por calor sobre o desenvolvimento da NE em frangos de corte. Empregou-se, para tal, modelos experimentais de NE em que se usou infecção isolada por *C. perfringens* e/ou em co-infecção com *Eimeria* spp. O estresse por calor foi aplicado de forma contínua ou intermitente em longo prazo. Foram propostos sete experimentos; em cinco deles os animais foram criados em câmaras isoladoras e, nos dois restantes, em galpões. Foram feitas avaliações da imunidade sistêmica, de órgãos linfoides secundários e do intestino delgado para determinar os efeitos imunomodulatórios da infecção e/ou do estresse por calor. Para caracterização dos efeitos neuroimunes, fizemos uma análise integrada dos achados imunes, de atividade do Sistema Nervoso Central e/ou de ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). Foram utilizadas medidas quantitativas e semi-quantitativas para avaliar os diferentes graus de lesão tecidual decorrentes do processo infeccioso e/ou parasitário com ou sem estresse por calor. Para analisar os efeitos do estresse no processo infeccioso/parasitário empregamos, também, cultivos microbiológicos e técnicas usadas para determinação da proliferação do *C. perfringens* e da *Eimeria* spp. Os resultados mostraram que o estresse por calor: reduziu a inflamação intestinal e o dano tecidual em modelo de NE empregando infecção isolada por *C. perfringens* preparada em caldo tioglicolato; reduziu a formação de centros germinais esplênicos e intestinais com consequente modulação da produção de imunoglobulinas séricas e secretórias; ativou núcleos do SNC

relacionados á atividade do eixo HPA; ativou o eixo cérebro-intestinal; diminuiu a infecção intestinal por *Eimeria* spp., com consequente redução do desenvolvimento da NE e da lesão tecidual dela resultante; modulou a atividade de sistemas de neurotransmissão central relacionados com o comportamento das aves e ativação do eixo HPA; alterou o perfil neuroquímico cerebral quando em associação com a NE; facilitou o desenvolvimento da infecção por *C. perfringens* em animais não desafiados por fatores predisponentes da NE; reduziu a lesão tecidual no modelo de co-infecção por *C. perfringens* e *Eimeria* spp.; modulou o balanço de citocinas para um padrão Th2 no intestino dos animais infectados ou não; alterou as subpopulações de linfócitos esplênicos e circulantes, bem como a função proliferativa destas células e a resposta das mesmas à expressão de citocinas. Desta forma, concluímos que o estresse por calor e/ou inflamação intestinal de origem infecciosa ou química ativam o eixo HPA por mecanismo que envolve o eixo cérebro-intestinal, reduzindo os sinais clínicos da NE por interferir na patogênese do *C. perfringens* e da *Eimeria* spp.

Palavras-chave: Neuroimunomodulação. Estresse por calor. *Clostridium perfringens*. *Eimeria* spp. Monoaminas cerebrais.

ABSTRACT

CALEFI, A. S. **Effects of heat stress on immunity of broilers in experimental models of avian necrotic enteritis**. [Avaliação dos efeitos do estresse por calor sobre a imunidade de frangos de corte em modelos experimentais de enterite necrótica aviária]. 2016. 255 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Diseases such as necrotic enteritis (NE) are coming back not only as a consequence of the intensive farming procedures now being used but also as a consequence of the restrictions imposed by the European Union countries to the use of antimicrobials as feed additives. NE is a disease that affects poultry production; its primary etiologic agent is *Clostridium perfringens* type A. Little is known about the mechanisms by which stress modulates the development of NE. Thus, to evaluate the effects of heat stress on NE development, seven studies were done using experimental models of NE that used *C. perfringens* infection *per se* or in combination with *Eimeria* spp. Heat stress was used throughout the experiments, being applied continuously or intermittently but always for long-term. Five experiments were performed using animals reared in isolator chambers and two others employing animals reared in sheds. Evaluations of systemic immunity, secondary lymphoid organs and small intestine portions were used to determine the immunomodulatory effects of the infections and/or of the heat stress. Neuroimmune effects were assessed using an integrative approach of the observed immune, Central Nervous System (CNS) and/or hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis changes. Quantitative and semi-quantitative techniques were utilized to measure and compare the different degrees of tissue damage resulting from the infectious processes in the presence and absence of heat stress. Microbiological techniques were also used to determine *C. perfringens* and *Eimeria* spp. proliferations. Results showed that heat stress: reduced intestinal inflammation and tissue damage in the NE model that used *C. perfringens* together with thioglycolate broth culture medium intake; reduced the formation of splenic and intestinal germinal centers with subsequent production of serum and secretory immunoglobulins; activated some brain areas related to animals' behavior and HPA axis activity; modified the brain-gut axis relationship during NE development; reduced *Eimeria* spp. infection leading to a subsequent reduction in the NE development and in the scores of tissue injury;

together with NE, modified neuronal brain-amine systems activity and, as a consequence, changed animal's behavior, HPA axis activity and brain amine systems function within some brain areas; predisposed the birds to *C. perfringens* infection in the presence or absence of NE inducing factors; reduced the tissue damages observed in the course of *C. perfringens* and *Eimeria* spp. co-infection; modulated cytokines to a Th2 pattern in animals infected or not; altered the splenic and peripheral blood lymphocytes subpopulations and, changed the proliferative function of immune cells and cytokine expression. Thus, we conclude that the heat stress and/or intestinal inflammation of infectious or chemical origin activate the HPA axis by a mechanism involving the brain-gut axis, reducing the clinical signs of NE by interfering in the pathogenesis of *C. perfringens* and *Eimeria* spp.

Keywords: Neuroimmunomodulation. *Clostridium perfringens*. *Eimeria* spp. Broiler chicken. Brain monoamines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Efeitos da infecção e/ou estresse por calor sobre o número de bactérias observadas na histologia do duodeno, jejuno e íleo dos frangos de corte	60
Figura 2 - Somatória total dos escores de lesão microscópicos no duodeno, jejuno dos frangos de corte	61
Figura 3 - Quantificação dos níveis séricos de corticosterona	77
Figura 4 - Quantificação dos níveis séricos de IgA, IgM e IgY	78
Figura 5 - Concentração dos níveis de IgA secretória no duodeno e jejuno	78
Figura 6 - Análise dos parâmetros histomorfométricos esplênicos	81
Figura 7 - Quantificação de CGs em intestinos corados por HE e imunomarcados para Bu-1	82
Figura 8 - Escores histopatológicos para inflamação e necrose intestinal	97
Figura 9 - Avaliação dos neurônios imunorreativos para c-fos em diferentes núcleos cerebrais	100
Figura 10 - Níveis séricos de corticosterona	101
Figura 11 - Quantificação dos níveis séricos de corticosterona livre e total	113
Figura 12 - Quantificação dos níveis de IgA secretória no duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte	114
Figura 13 - Análise morfométrica dos vilos, criptas e relação vilo:cripta do duodeno, jejuno e íleo	118
Figura 14 - Heatmap com as concentrações médias dos neurotransmissores no córtex pré-frontal	132
Figura 15 - Heatmap com as concentrações médias dos neurotransmissores no hipotálamo.....	133
Figura 16 - Heatmap com as concentrações médias dos neurotransmissores no mesencéfalo	134
Figura 17 - Heatmap com as concentrações médias dos neurotransmissores no tronco encefálico	135
Figura 18 - Níveis séricos de corticosterona livre e total nos frangos de corte.....	150
Figura 19 - Efeitos do estresse por calor na contagem de Clostridium perfringens no ceco dos frangos de corte	151

Figura 20 - Escores de lesão macroscópico no duodeno, jejuno dos frangos de corte	152
Figura 21 - Escores de lesão microscópicos no duodeno, jejuno dos frangos de corte	153
Figura 22 - Heatmap com as expressões de citocinas relativas no duodeno dos frangos	155
Figura 23 - Painel com matriz de gráficos de dispersão para a expressão relativa de citocinas no duodeno por grupo.....	156
Figura 24 - Heatmap com as expressões de citocinas relativas no jejuno dos frangos	158
Figura 25 - Painel com matriz de gráficos de dispersão para a expressão relativa de citocinas no jejuno por grupo	159
Figura 26 - Heatmap com as expressões de citocinas relativas no íleo dos frangos	161
Figura 27 - Painel com matriz de gráficos de dispersão para a expressão relativa de citocinas no íleo por grupo	162
Figura 28 - Heatmap com as expressões de citocinas relativas na tonsila cecal dos frangos.....	164
Figura 29 - Painel com matriz de gráficos de dispersão para a expressão relativa de citocinas na tonsila cecal por grupo	165
Figura 30 - Expressão relativa de T-bet no duodeno, jejuno, íleo e tonsila cecal de frangos de corte	167
Figura 31 - Expressão relativa de TLR2, TLR4 eMyD88 no duodeno de frangos de corte	168
Figura 32 - Expressão relativa de TLR2, TLR4 eMyD88 no jejuno de frangos de corte	169
Figura 33 - Expressão relativa de TLR2, TLR4 eMyD88 no íleo de frangos de corte	170
Figura 34 - Expressão relativa de TLR2, TLR4 e MyD88 na tonsila cecal de frangos de corte	171
Figura 35 - Quantificação dos níveis séricos de IgA, IgM e IgY	190
Figura 36 - Análise dos componentes principais da expressão relativa das citocinas no baço dos frangos de corte	191
Figura 37 - Heatmap com a expressão média de citocinas no baço	192

Figura 38 - Painel com matriz de gráficos de dispersão para a expressão relativa de citocinas no baço por grupo.....	194
Figura 39 - Expressão relativa de CCR6, CCR7 e CX3CR1 no baço de frangos de corte	196
Figura 40 - Expressão relativa de TLR2 e TLR4 no baço de frangos de corte.....	197
Figura 41 - Heatmap com as porcentagens médias das populações de linfócitos esplênicos	198
Figura 42 - Proliferação de linfócitos esplênicos estimulados com concavalina A ..	199
Figura 43 - Proliferação de linfócitos esplênicos estimulados com lipopolissacarídeo.....	200
Figura 44 - Heatmap com as porcentagens médias das populações de linfócitos, monócitos/macrófagos e heterófilos circulantes.....	201
Figura 45 - Heatmap com as porcentagens médias das sub-populações de linfócitos CD8 $\alpha\alpha$ e CD8 $\alpha\beta$ circulantes.....	202

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem de escores para lesões histológicas encontradas no duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte de todos os grupos experimentais	59
Tabela 2 - Peso corporal e peso relativo do baço e Bursa de Fabricius em frangos submetidos a diferentes tratamentos.....	79
Tabela 3 - Alterações comportamentais induzidas pelo estresse por calor e/ou infecção por <i>C. perfringens</i>	98
Tabela 4 - Escores de lesão histopatológica do duodeno, jejuno e íleo (mediana [max/min]).....	115
Tabela 5 - Frequência de ocorrência de abscesso, úlcera e lesão transmural no Duodeno, Jejuno e Íleo	116
Tabela 6 - Quantificação dos estádios de <i>Eimeria</i> spp. no duodeno, jejuno e íleo (mediana [max/min])	119
Tabela 7 - Quantificação dos neurotransmissores no córtex pré-frontal (média±SE)	245
Tabela 8 - Quantificação dos neurotransmissores no hipotálamo (média±SE)	245
Tabela 9 - Quantificação dos neurotransmissores no mesencéfalo (média±SE)	246
Tabela 10 - Quantificação dos neurotransmissores no tronco encefálico (média±SE)	246
Tabela 11- Escores de lesão histopatológicos do duodeno, jejuno e íleo (mediana [max/min]).....	248
Tabela 12 - Frequência de ocorrência de abscesso e lesão transmural no duodeno, jejuno e íleo	249
Tabela 13 - Expressão relativa das citocinas no duodeno dos frangos de corte.....	249
Tabela 14 - Expressão relativa das citocinas no jejuno dos frangos de corte	250
Tabela 15 - Expressão relativa das citocinas no íleo dos frangos de corte.....	251
Tabela 16 - Expressão relativa das citocinas na tonsila cecal dos frangos de corte	252
Tabela 17- Expressão relativa das citocinas no baço dos frangos de corte.....	253
Tabela 18 - Média ± erro padrão dos diferentes fenótipos celulares esplênicos.....	253
Tabela 19 - Média ± erro padrão das porcentagens de fenótipos TCRγδ ⁺ e TCRγδ ⁻ circulantes	254

Tabela 20- Médias erro padrão das médias dos fenótipos de leucócitos
esplênicos255

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
6-OHDA	6-hidroxidopamina
Δ_2	Distância no plano
Δ_3	Distância no espaço
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AD	Adrenalina
Agc	Área de centro germinal na secção
Amy	Amígdala
ANOVA	Análise de variância
Asp	Área do perfil do baço
AVP	Arginina vasopressina
BC	Hemáceas de carneiro
BHI	Meio infusão de cérebro e coração
BSA	Soroalbumina bovina
CCR6	Receptor 6 da quimiocina CC
CCR7	Receptor 7 da quimiocina CC
ConA	Concavalina A
CD	Comportamento doentio
DC	Células dendríticas
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CG	Centros germinais
CMM	Meio de carne cozida
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CX3CR1	Receptor 1 da quimiocina CX3C
D	Diâmetro médio
DA	Dopamina
DOPAC	Ácido 4,4-diidroxifenilacético

DHBA	3,4 diidroxibenzilamina
ED	Dia experimental
EDTA	Ácido diamino etileno tetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FMO	Fluorescência-menos-um
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GI	Gastrointestinal (trato)
GP	Globus pallidus
GH	Hormônio do crescimento
GALT	Tecido linfoide associado a mucosa
GR	Receptor de glicocorticóide
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HPA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
HPLC-ED	Cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a detector eletroquímico
HHT	Hipotálamo-hipófise-tireóide
HSP	Proteínas do choque térmico
HE	Hematoxilina e eosina
HEPA	Filtros com alta eficiência na separação de partículas
HS35	Estresse por calor a 35°C
HS34	Estresse por calor a 34°C
HVA	Ácido homovanílico
Ig	Imunoglobulina
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IEGs	Genes precoces imediatos celulares
IEL	Linfócitos interepiteliais
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1
LPS	Lipopolissacarídeo
LITAF	Fator de necrose tecidual induzido por lipopolissacarídeo
MFT	Meio fluido tioglicolato

MHPG	3-metoxi-4-hidroxifenilglicol
MIP	Proteína inflamatória macrofágica
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NE	Enterite necrótica aviária
NF-κB	Fator nuclear kappa B
Nvgc	Densidade numérica do centro germinal
Ngcsp	Densidade numérica dos centros germinativos no baço
Nagc	Número de centros germinais por 1mm ² de baço
NK	Natural killer
NOR	Noradrenalina
PAMPS	Padrões moleculares associados aos patógenos
PBS	Tampão fosfato
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoreto
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
PCA	Análise do componente principal
PCR	Reação em cadeia da polimetase
PAS	Ácido periódico de Schiff
PB	Proteína bruta
POM	Núcleo préoptico medial
RNA	Ácido ribonucleico
SPF	Livre de patógenos específicos
SNC	Sistema nervoso central
SN	Sistema nervoso
SNAS	Sistema nervoso autônomo simpático
SNAP	Sistema nervoso autônomo parassimpático
SI	Sistema imune
slg	Imunoglobulina secretória
Th1	Linfócitos T auxiliares tipo 1
Th2	Linfócitos T auxiliares tipo 2
Th17	Linfócitos T auxiliares tipo 17

TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TSH	Hormônio estimulador da tireóide
TLR	Receptores do tipo Toll
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
T-bet	Fator de transcrição associados aos linfócitos T
TRH	Hormônio liberador de tireotrofina
TNFS15	Superfamília 15 do fator de necrose tecidual
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TNF	Fator de necrose tumoral
ufcs	Unidades formadoras de colônias
Vgc	Densidade volumétrica do centro germinal
v/v	Volume/volume
VMA	Ácido vanilmandélico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	27
2	OBJETIVOS	33
2.1	OBJETIVO GERAL.....	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3	NEUROIMUNOMODULAÇÃO E ESTRESSE TÉRMICO EM AVES: UMA REVISÃO	35
3.1	INTRODUÇÃO	35
3.2	NEUROIMUNOMODULAÇÃO EM AVES.....	36
3.3	NEUROIMUNOMODULAÇÃO E ESTRESSE TÉRMICO.....	44
4	EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO POR CALOR SOBRE AS ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS E NA ADESÃO BACTERIANA INTESTINAL EM MODELO EXPERIMENTAL DE ENTERITE NECRÓTICA AVIÁRIA.....	49
4.1	INTRODUÇÃO	49
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.2.1	Animais	50
4.2.2	Formação de grupos e estresse por calor	51
4.2.3	Protocolo de infecção e preparo do inoculo de <i>Clostridium perfringens</i>	52
4.2.4	Avaliação macroscópica intestinal.....	53
4.2.5	Avaliação histopatológica	54
4.2.6	Identificação bacteriana.....	56
4.2.7	Análise estatística	56
4.3	RESULTADOS	57
4.3.1	Avaliação macroscópica e determinação de escores de lesão intestinal.....	57
4.3.2	Avaliação microscópica intestinal.....	58
4.3.3	Identificação bacteriana.....	61
4.4	DISCUSSÃO	62
5	EFEITOS DO ESTRESSE POR CALOR SOBRE A FORMAÇÃO DE CENTROS GERMINAIS ESPLÊNICOS E INTESTINAIS E A	

	PRODUÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS EM FRANGOS DE CORTE	
	INFECTADOS POR <i>Clostridium perfringens</i> TIPO A	67
5.1	INTRODUÇÃO	67
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	68
5.2.1	Animais	68
5.2.2	Formação de grupos	69
5.2.3	Protocolo de estresse por calor.....	69
5.2.4	Preparo do inóculo e protocolo de infecção.....	69
5.2.5	Quantificação dos CGs intestinais	70
5.2.6	Identificação bacteriana.....	71
5.2.7	Quantificação dos níveis de IgA intestinal.....	72
5.2.8	Quantificação de corticosterona no soro.....	72
5.2.9	Quantificação IgA, IgM e IgY no soro	72
5.2.11	Preparações do baço e avaliações morfométricas	73
5.2.12	Análise estatística	74
5.3	RESULTADOS	75
5.3.1	Confirmação da infecção.....	75
5.3.2	Níveis de imunoglobulina intestinal (sIgA)	76
5.3.3	Níveis séricos de imunoglobulinas.....	75
5.3.4	Níveis séricos de corticosterona	75
5.3.5	Peso corporal e pesos relativos do baço e Bursa de Fabricius.....	78
5.3.6	Avaliações morfométricas do baço	80
5.3.7	Quantificação dos CGs duodenais	82
5.4	DISCUSSÃO	83
6	EFEITOS DO ESTRESSE POR CALOR SOBRE A PRODUÇÃO DE	
	CORTICOSTERONA, HISTOPATOLOGIA INTESTINAL E	
	EXPRESSÃO DE C-FOS NO CÉREBRO DE FRANGOS DE CORTE	
	INFECTADOS POR <i>Clostridium perfringens</i> TIPO A	88
6.1	INTRODUÇÃO	88
6.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	89
6.2.1	Animais	89
6.2.2	Grupos experimentais e estresse por calor.....	90
6.2.3	Manejo alimentar	91
6.2.4	Preparo do inóculo e protocolo de infecção.....	91

6.2.5	Avaliação comportamental.....	92
6.2.6	Preparo do tecido cerebral e imunohistoquímica para c-fos	92
6.2.7	Avaliações macroscópicas e histopatológicas	93
6.2.8	Identificação bacteriana.....	94
6.2.9	Quantificação de corticosterona no soro.....	94
6.2.10	Análise estatística	95
6.3	RESULTADOS	95
6.3.1	Avaliações comportamentais.....	95
6.3.2	Análises macroscópicas e histopatológicas intestinais.....	96
6.3.3	Avaliação histopatológica intestinal.....	96
6.3.4	Expressão de c-fos no SNC.....	99
6.3.5	Identificação bacteriana.....	101
6.4	DISCUSSÃO	102
7	EFEITOS DO ESTRESSE POR CALOR SOBRE A HISTOPATOLOGIA E MORFOMETRIA INTESTINAL, PRODUÇÃO DE CORTICOSTERONA E DE IMUNOGLOBULINAS EM FRANGOS DE CORTE INFECTADOS POR <i>Clostridium perfringens</i> TIPO A COM OU SEM CO-INFEÇÃO POR <i>Eimeria</i> spp.....	106
7.1	INTRODUÇÃO	106
7.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	108
7.2.1	Animais	108
7.2.2	Formação de grupos	108
7.2.3	Protocolo de estresse por calor.....	109
7.2.4	Protocolo de infecção por <i>Eimeria</i> spp.....	109
7.2.5	Preparo do inóculo e protocolo de infecção por <i>C. perfringens</i>	109
7.2.6	Quantificação de corticosterona livre e total.....	110
7.2.7	Quantificação dos níveis de IgA no lavado intestinal	110
7.2.8	Determinação do escore lesional microscópico	111
7.2.9	Morfometria intestinal	111
7.2.10	Quantificação dos estádios de <i>Eimeria</i> spp. intracelular intestinal....	112
7.2.11	Análise estatística	112
7.3	RESULTADOS	113
7.3.1	Quantificação de corticosterona livre e total.....	113
7.3.2	Quantificação dos níveis de IgA no lavado intestinal	114

7.3.3	Determinação do escore lesional microscópico	114
7.3.4	Morfometria intestinal	117
7.3.5	Quantificação dos estádios de <i>Eimeria</i> spp. intracelular intestinal....	118
7.4	DISCUSSÃO	120
8	EFEITOS DO ESTRESSE POR CALOR SOBRE A PRODUÇÃO DE MONOAMINAS E DE SEUS METABÓLITOS NO CÉREBRO DE FRANGOS DE CORTE INFECTADOS POR <i>Clostridium perfringens</i> TIPO A COM OU SEM CO-INFECÇÃO POR <i>Eimeria</i> spp.	125
8.1	INTRODUÇÃO	125
8.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	127
8.2.1	Animais	127
8.2.2	Formação de grupos	127
8.2.3	Protocolo de estresse por calor.....	128
8.2.4	Protocolo de infecção por <i>Eimeria</i> spp.	128
8.2.5	Preparo do inóculo e protocolo de infecção por <i>C. perfringens</i>	128
8.2.6	Coleta e processamento dos tecidos cerebrais	129
8.2.7	Preparo das amostras e quantificação dos neurotransmissores	129
8.2.8	Análise estatística	130
8.3	RESULTADOS	131
8.3.1	Quantificação dos neurotransmissores nas estruturas cerebrais	131
8.4	DISCUSSÃO	135
9	EFEITOS DO ESTRESSE POR CALOR SOBRE O BALANÇO DE CITOCINAS TH1/TH2, AS ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS E A EXPRESSÃO DE RECEPTORES DO TIPO TOLL NO INTESTINO DELGADO DE FRANGOS DE CORTE INFECTADOS POR <i>Clostridium perfringens</i> TIPO A COM OU SEM CO-INFECÇÃO POR <i>Eimeria</i> spp.	141
9.1	INTRODUÇÃO	141
9.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	143
9.2.1	Animais	143
9.2.2	Formação de grupos	143
9.2.3	Protocolo de estresse por calor.....	144
9.2.4	Protocolo de infecção por <i>Eimeria</i> spp.	144
9.2.5	Preparo do inoculo e protocolo de infecção por <i>C. perfringens</i>	144

9.2.6	Quantificação de corticosterona livre e total.....	145
9.2.7	Quantificação de <i>C. perfringens</i> em conteúdo cecal	145
9.2.8	Avaliação macroscópica intestinal.....	146
9.2.9	Avaliação microscópica intestinal.....	146
9.2.10	Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	147
9.2.11	Quantificação das citocinas através de PCR em tempo real.....	147
9.2.12	Análise estatística	149
9.3	RESULTADOS.....	149
9.3.1	Quantificação dos níveis de corticosterona sérica livre e total	149
9.3.2	Contagem de ufc de <i>Clostridium perfringens</i> no conteúdo cecal	150
9.3.3	Avaliação macroscópica intestinal.....	151
9.3.4	Avaliação microscópica intestinal.....	152
9.3.5	Expressão relativa das citocinas e T-bet no intestino delgado de frangos de corte.....	153
9.3.5.1	Duodeno.....	154
9.3.5.2	Jejuno.....	157
9.3.5.3	Íleo.....	160
9.3.5.4	Tonsila Cecal.....	163
9.3.5.5	Expressão relativa de T-bet nas porções intestinais.....	166
9.3.6	Expressão relativa de TLR2, TLR4 e MyD88	167
9.4	DISCUSSÃO	171
10	EFEITOS DO ESTRESSE POR CALOR SOBRE OS FENÓTIPOS DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES E ESPLÊNICOS, PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS, BALANÇO DE CITOCINAS TH1/TH2/TH17 E EXPRESSÃO DE RECEPTORES DO TIPO TOLL, CCR6, CCR7, CX3CR1 NO BAÇO DE FRANGOS DE CORTE INFECTADOS POR <i>Clostridium perfringens</i> TIPO A COM OU SEM CO-INFECÇÃO POR <i>Eimeria</i> SPP.	180
10.1	INTRODUÇÃO	180
10.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	181
10.2.1	Animais	181
10.2.2	Formação de grupos	182
10.2.3	Protocolo de estresse por calor.....	182

10.2.4	Protocolo de infecção por <i>Eimeria</i> spp.	183
10.2.5	Preparo do inóculo e protocolo de infecção por <i>C. perfringens</i>	183
10.2.6	Quantificação sérica de IgA, IgM e IgY	184
10.2.7	Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	184
10.2.8	Quantificação das citocinas através de PCR em tempo real.....	184
10.2.9	Imunofenotipagem de leucócitos circulantes e esplênicos	186
10.2.10	Ensaio de proliferação de Linfócitos B e T esplênicos.....	187
10.2.11	Anticorpos	188
10.2.12	Análise estatística	188
10.3	RESULTADOS	189
10.3.1	Quantificação sérica de IgA, IgM e IgY	189
10.3.2	Expressão relativa das citocinas no baço de frangos de corte	191
10.3.3	Expressão relativa de CCR6, CCR7 e CX3CR1	195
10.3.4	Expressão relativa de TLR2 e TLR4.....	196
10.3.5	Imunofenotipagem de leucócitos esplênicos	197
10.3.6	Ensaio de proliferação de linfócitos esplênicos.....	198
10.3.7	Imunofenotipagem de leucócitos circulantes.....	201
10.4	DISCUSSÃO	203
11	CONSIDERAÇÕES FINAIS	210
12	CONCLUSÕES	212
12.1	CONCLUSÕES ESPECÍFICAS.....	212
12.2	CONCLUSÃO GERAL.....	213
	REFERÊNCIAS	214
	APÊNDICES.....	245

1 INTRODUÇÃO GERAL

É indiscutível: o ganho em volume e qualidade no sistema produtivo avícola depende diretamente do equilíbrio gastrointestinal dos animais. A maior parte das perdas econômicas, da redução do bem estar animal, e até mesmo, do aumento dos riscos de produtos de origem animal à alimentação humana está, de alguma forma, associada às enterites (SKIRROW, 1991; VAN IMMERSEEL et al., 2004). A enterite necrótica (NE) é um exemplo de afecção que tem sido relacionada a perdas econômicas superiores a US\$ 2 bilhões anuais (SLUIS, 2000; SKINNER et al., 2010). Esta doença vem aumentando nos últimos anos em criações avícolas principalmente em países da União Europeia (UE), fato este provavelmente associado à proibição do uso de antimicrobianos como aditivos zootécnicos melhoradores da conversão alimentar (IMMERSEEL et al., 2009). A NE tem como agente etiológico o *Clostridium perfringens* tipo A (PARISH, 1961b). Por ser uma bactéria da microbiota autóctone das aves, o clostrídio pode se desenvolver de forma descontrolada em decorrência de diminuição da imunidade e/ou de desequilíbrios da microbiota (ELWINGER et al., 1998). Estes fatores têm sido associados a problemas de manejo, seja por “desbalanço” alimentar ou submissão ainda que involuntária dos animais a condições estressantes (MCFARLANE et al., 1989). Neste contexto, o uso de antimicrobianos parece compensar, de certa forma, possíveis falhas de manejo, visto que a proibição do uso dos mesmos como aditivo tem sido associada ao retorno da NE na avicultura europeia (GRAVE et al., 2004).

Além das relevantes perdas econômicas associadas à doença ela constitui, também, um importante fator de risco à Saúde Pública. De fato, devido ao caráter toxigênico das cepas de clostrídios, as carcaças dos animais acometidos de NE podem ser contaminadas durante o abate das aves, carreando potencial para produzir toxinfecção alimentar, caso sejam consumidas (Immerseel, van et al., 2004). Nesse sentido, os diferentes tipos de *C. perfringens* produzem sinais clínicos distintos, porém não menos importantes, em humanos. As cepas do tipo A foram associadas a quadros de diarreias autolimitantes em humanos, enquanto que a intoxicação produzida por toxinas do tipo C foi associada a quadros de enterite necrótica severa capaz, até mesmo, de levar à morte (SCHIEMANN, 1977; HOOK;

JALALUDIN; FITZSIMMONS, 1996; MIWA et al., 1998; CRAVEN et al., 2001; GRAVE et al., 2004).

A NE foi descrita pela primeira vez por Parish em 1961a,b, que também isolou o *Clostridium welchii*; posteriormente, esta bactéria foi reclassificada como *C. perfringens*. Em outro estudo realizado no mesmo ano, o autor reproduziu experimentalmente a doença (PARISH, 1961c).

A NE acomete principalmente frangos de corte de 2 a 6 semanas de vida e galinhas poedeiras até os 6 meses de vida. Existem relatos informando que a doença pode se desenvolver em linhagens comerciais de até 112 dias de vida. (GARDINER, 1967; NAIRN; BAMFORD, 1967; BAINS, 1968; HELMBOLDT; BRYANT, 1971; JOHNSON; PINEDO, 1971; BERNIER; PHANEUF; FILION, 1977; TSAI; TUNG, 1981; FRAME; BICKFORD, 1986; DHILLON et al., 2004).

O diagnóstico de NE inicia-se com a busca por algum fator predisponente existente no plantel. Embora tenha sido possível determinar alguns fatores predisponentes ao desenvolvimento da NE, sua etiologia complexa e a dificuldade de sua reprodução em condições experimentais têm dificultado a definição do mecanismo responsável por seu início (TIMBERMONTA et al., 2011). De forma geral, o desenvolvimento da doença tem sido associado à formulação da ração, à presença de co-infecções com outros patógenos (em especial as coccídias), à retirada dos aditivos antimicrobianos, ou dos coccidiostáticos e, à mudanças nas condições ambientais (DROUAL; FARVER; BICKFORD, 1995; DAHIYA et al., 2006).

Mudanças na alimentação das aves, como por exemplo, na proporção que ela apresenta de milho, trigo e cevada ou a adição de proteínas de origem animal alteraram o trânsito intestinal e modulam a microbiota predispondo ao desenvolvimento da NE (BRANTON, REECE E HAGLER JR., 1987; KALDHUSDAL E HOFSHAGEN, 1992; RIDDELL E KONG, 1992; ANNETT et al., 2002; BJERRUM, PEDERSEN E ENGBERG, 2005). Mostrou-se, na vigência de quadros de casos de NE, que a adição de proteína animal à alimentação piora a gravidade das lesões intestinais; fato oposto foi relatado quando do aumento da proporção de fibras e de carboidratos complexos na dieta (BRANTON; REECE; HAGLER JR., 1987; BRANTON et al., 1997). A substituição da cevada e do milho por trigo também se mostrou capaz de reduzir as lesões durante o curso de uma enterite necrótica. Mostrou-se, também, que o fornecimento de substratos favoráveis à multiplicação

bacteriana aumentou a expressão de genes que traduzem as toxinas bacterianas (DREW et al., 2004; SHIMIZU, 2004; DAHIYA et al., 2005).

Sabe-se ser a lesão do epitélio intestinal um dos principais fatores predisponentes ao desenvolvimento da NE na avicultura industrial; o principal agente causal de lesões a nível de campo são as coccidioses como a *Eimeria spp.* (AL-SHEIKHLY; AL-SAIEG, 1980; WILLIAMS et al., 2003). A destruição parcial da mucosa intestinal contribui não apenas para uma maior adesão bacteriana como, também, para um maior extravasamento de proteínas; este maior fornecimento de substrato favorece a multiplicação bacteriana, permitindo uma maior produção destas toxinas bacterianas e, via de consequência um maior aporte aos seus sítios de ação (MCCLANE; CHAKRABARTI, 2004; COOPER; SONGER, 2010; COURSON et al., 2010). Desta forma e por isso mesmo, a exclusão do uso dos antimicrobianos como aditivos na ração tem sido considerada um fator predisponente ao desenvolvimento da NE tanto pela ação direta que eles têm sobre o clostrídio, quanto pela predisposição ao desenvolvimento de processos infecciosos intestinais, mesmo que subclínicos (DROUAL; FARVER; BICKFORD, 1995).

O desenvolvimento da NE é rápido e grave e os sinais clínicos observados são inespecíficos (FUKATA et al., 1988). Os principais sinais e sintomas relatados em aves incluem diminuição da movimentação, do consumo de ração, apatia, diarreia e eriçamento das penas (AL-SHEIKHLY; TRUSCOTT, 1977). Com exceção da diarreia, os demais sinais são reflexos inespecíficos do comportamento doente (JOHNSON, 2002).

O exame necroscópico de aves com NE mostrou distensão das alças intestinais por gás com aparecimento de lesões características e mais restritas ao intestino delgado; no entanto, foram descritas também lesões com menor frequência no ceco, no fígado e em outros órgãos (PARISH, 1961a). A mucosa intestinal apresenta-se com coloração enegrecida a arroxeada. Segundo Helmboldt e Bryant (1971) a distribuição e a intensidade das lesões variam com a gravidade da doença. A friabilidade do tecido intestinal e o dano às vilosidades culminam com a formação de uma pseudomembrana de coloração verde amarelada denominada de “toalha turca” ou “toalha felpuda” (LONG; PETTIT; BARNUM, 1974; GOLDBERGER et al., 2011). Em casos mais graves ocorre fibronecrose intestinal difusa (BALAUCA, 1976; SHANE et al., 1985). O destacamento da serosa, a alteração na espessura da parede intestinal, a presença de conteúdo descamativo e a irregularidade no

contorno da mucosa são outros achados macroscópicos encontrados na NE. Nos casos subclínicos os achados são mais focais, com formação de regiões de coloração acinzentada a enegrecida ou, às vezes, discretamente avermelhadas (KALDHUSDAL; HOFSHAGEN, 1992; LOVLAND; KALDHUSDAL, 2001).

Como o próprio nome da doença sugere, a principal característica da NE é o desenvolvimento de necrose multifocal coalescente da mucosa; próximo à região de necrose ocorre a formação de um tecido fibrinoso em associação com o debri resultante do processo infeccioso (NAIRN; BAMFORD, 1967; HELMBOLDT; BRYANT, 1971; TSAI; TUNG, 1981). O processo de necrose de coagulação ocorre preferencialmente no topo dos vilos, estendendo-se da superfície do epitélio à lâmina própria. Junto das lesões é possível encontrar uma quantidade abundante de bacilos pleomórficos Gram positivos aderidos à superfície das regiões lesionadas, devido à capacidade de adesão que eles têm às moléculas da matriz extracelular (SHANE et al., 1985; ROOD, 1998). O processo inflamatório é caracterizado pela migração massiva de heterófilos para as regiões em que ocorre a necrose, e intenso infiltrado linfoplasmocitário na lâmina basal, fatos acompanhados por edema, hiperemia, congestão e hemorragia da lâmina própria, submucosa e serosa. O processo de regeneração tecidual produz, de modo geral, fusão e atrofia das vilosidades com diminuição das células de Globet e perda acentuada dos microvilos (NAIRN; BAMFORD, 1967; HELMBOLDT; BRYANT, 1971; LONG; PETTIT; BARNUM, 1974).

A maior parte dos modelos experimentais de enterite necrótica aviária utiliza uma combinação de infecção bacteriana com infecção parasitária (coccídeos) (AL-SHEIKHLY; AL-SAIEG, 1980; SHANE et al., 1985). Cooper e Songer (2010) propuseram um modelo experimental de infecção por *C. perfringens* que não utiliza a co-infecção; este modelo propõe o fornecimento da cepa patogênica de *C. perfringens* em meio de cultura caldo tioglicolato misturado à ração dos animais. No entanto, há que lembrar que o potencial inflamatório do tioglicolato empregado neste modelo pode interferir com os resultados do estudo (CALEFI et al., 2014, 2016a).

Devido à complexidade etiológica da NE, a presente tese buscou determinar os efeitos do estresse por calor sobre o desenvolvimento da mesma. Mais especificamente, procuramos analisar, neste trabalho, as principais variáveis envolvidas com os efeitos do estresse por calor sobre o desenvolvimento da NE. Assim pensando, pareceu-nos interessante subdividi-la em capítulos, redigidos na

forma de artigos científicos. Desta forma, fazemos uma revisão sobre neuroimunomodulação em aves no capítulo 3, enfatizando o uso do calor, resultante do aumento da temperatura ambiente, como agente estressor. No capítulo 4 abordamos os efeitos da aplicação contínua e a longo prazo de um estresse por calor em frangos de corte criados e mantidos em isoladores e infectados com *C. perfringens*; este capítulo prioriza a análise das alterações histopatológicas intestinais observadas. No capítulo 5 também estudamos os efeitos de um estresse por calor aplicado de forma contínua e a longo prazo em frangos de corte infectados com *C. perfringens* e criados em isoladores; neste capítulo, no entanto, damos ênfase às modulações exercidas pelas imunoglobulinas secretórias, à formação de centros germinais (CGs) esplênicos e às características do intestino delgado. No capítulo 6 usamos o mesmo modelo experimental, isto é, abordamos os efeitos do estresse por calor contínuo e aplicado a longo prazo em frangos de corte infectados com *C. perfringens* e criados em isoladores sobre o comportamento e ativação neuronal do SNC; analisamos aqui o comportamento das aves e a atividade neuronal em regiões do SNC das mesmas, por meio da imunomarcagem da c-fos. No capítulo 7 estudamos os efeitos do estresse por calor intermitente aplicado a longo prazo em frangos de corte infectados ou co-infectados com *C. perfringens* e *Eimeria* spp. e criados no chão, em cama de cepilho; avaliamos dados de morfometria e histopatologia intestinal, bem como os níveis de imunoglobulinas secretórias. O capítulo 8 também foi dedicado ao estudo dos efeitos do estresse por calor intermitente aplicado a longo prazo em frangos de corte infectados ou co-infectados com *C. perfringens* e *Eimeria* spp. e criados no chão em cama de cepilho; porém, enfatizamos neste trabalho o perfil neuroquímico cerebral dos animais. O capítulo 9 foi dedicado ao estudo dos efeitos do estresse por calor intermitente aplicado a longo prazo em frangos de corte infectados ou co-infectados com *C. perfringens* e *Eimeria* spp. e criados em isoladores sobre a expressão de citocinas e níveis de lesão intestinal; buscou-se neste capítulo envolver as citocinas com os achados experimentais obtidos. No capítulo 10 analisamos os efeitos do estresse por calor intermitente aplicado a longo prazo em frangos de corte infectados ou co-infectados com *C. perfringens* e *Eimeria* spp. e criados em isoladores sobre a expressão de citocinas, a proliferação de linfócitos no baço e o perfil fenotípico de leucócitos circulantes; mais uma vez, tentamos compreender os fenômenos obtidos por meio

de uma abordagem mais verticalizada. Por fim, no capítulo 11 e 12 fazemos uma análise conjunta dos dados obtidos e apresentamos as conclusões desta tese.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do estresse por calor sobre parâmetros imunes, neurológicos e anatomopatológicos em frangos de corte na vigência de uma infecção por *C. perfringens* associada ou não a uma co-infecção por *Eimeria* spp.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar dentro de uma perspectiva de neuroimunomodulação:

- Os efeitos do estresse térmico por calor sobre as alterações anatomopatológicas e de adesão bacteriana intestinal em modelo experimental de enterite necrótica aviária;
- Os efeitos do estresse por calor sobre a formação de centros germinais esplênicos e intestinais e a produção de imunoglobulinas em frangos de corte infectados por *Clostridium perfringens* tipo A;
- Os efeitos do estresse por calor sobre a produção de corticosterona, histopatologia intestinal e expressão de c-fos no cérebro de frangos de corte infectados por *Clostridium perfringens* tipo A;
- Os efeitos do estresse por calor sobre a histopatologia e morfometria intestinal, produção de corticosterona e de imunoglobulinas em frangos de corte infectados por *Clostridium perfringens* tipo A com ou sem co-infecção por *Eimeria* spp.;
- Os efeitos do estresse por calor sobre a produção de monoaminas e de seus metabólitos no cérebro de frangos de corte infectados por *Clostridium perfringens* tipo A com ou sem co-infecção por *Eimeria* spp.;
- Os efeitos do estresse por calor sobre o balanço de citocinas Th1/Th2, as alterações anatomopatológicas e a expressão de receptores do tipo Toll no

intestino delgado de frangos de corte infectados por *Clostridium perfringens* tipo A com ou sem co-infecção por *Eimeria* spp.;

- Os efeitos do estresse por calor sobre os fenótipos de leucócitos circulantes e esplênicos, proliferação de linfócitos, balanço de citocinas Th1/Th2/Th17 e expressão de receptores do tipo Toll, CCR6, CCR7, CX3CR1 no baço de frangos de corte infectados por *Clostridium perfringens* tipo A com ou sem co-infecção por *Eimeria* spp.

3 NEUROIMUNOMODULAÇÃO E ESTRESSE TÉRMICO EM AVES: UMA REVISÃO

3.1 INTRODUÇÃO

O estresse é considerado um dos principais fatores limitantes da avicultura industrial (HUMPHREY, 2006). Muitos estudos têm demonstrado sua relação com queda nos parâmetros zootécnicos dos animais como, por exemplo, do peso, da conversão alimentar e das taxas reprodutivas (ST-PIERRE; COBANOV; SCHNITKEY, 2003).

Parece-nos lícito afirmar que os estudos conduzidos sobre estresse tenham se iniciado com o trabalho pioneiro feito por Hans Selye (1936); este autor analisou os efeitos de uma diversidade de agentes nocivos em ratos sugerindo o desenvolvimento de uma síndrome chamada, na época, de “Síndrome de Adaptação Geral” nos animais que estudou. Em 1955, mostrou-se que essa síndrome decorria de processos adaptativos desencadeados por estímulos externos, levando à sua posterior denominação de estresse e o seu agente desencadeante de estressor (SELYE, 1955). Designa-se como estressor qualquer estímulo (ambiental, psicológico, imunológico ou comportamental) capaz de gerar uma alteração fisiológica de estresse, mensurável através dos níveis circulantes de corticosteroides e/ou de adrenalina e noradrenalina (COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010). Em curto prazo, a reação ao estímulo é geralmente adaptativa; no entanto, se o estímulo persiste, sua cronicidade desencadeia efeitos graves (GLASER; KIECOLT-GLASER, 2005).

Com o avanço da pesquisa biomédica, um novo campo se abriu: a neuroimunomodulação ou psiconeuroimunologia, uma ciência que se ocupa em desvendar as delicadas relações bidirecionais existentes entre os sistemas neuroendócrino e imune (ADER; COHEN; FELTEN, 1995; COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010).

Neste contexto, é importante ressaltar que diversos fatores ambientais como estado nutricional, fisiológico e social podem gerar estresse em animais (BERCZI, 1998; MCEWEN, 2000). O calor é um tipo particular e relevante de estressor ambiental. As altas temperaturas ambientais, além de causarem desconforto físico em animais de produção, carregam potencial para produzir inúmeros transtornos fisiológicos e, via de consequência diminuir a produção (MASHALY et al., 2004; QUINTEIRO-FILHO; RIGHI; PALERMO-NETO, 2009).

Devido às possíveis variações climáticas que interferem com o sistema produtivo avícola, defende-se a premissa de que estudos enfocando aspectos das relações neuroimunes em frangos de corte submetidos a um estresse térmico por calor sejam importantes para o direcionamento de bases racionais para a reversão de eventuais alterações desencadeadas pelo calor, em especial, na mucosa intestinal e na microbiota dos animais.

3.2 NEUROIMUNOMODULAÇÃO EM AVES

Como já salientado em 1936, Hans Selye iniciou um estudo em que fazia aplicação de diferentes “nóxios” em ratos; ele observou o desenvolvimento de uma resposta estereotipada e semelhante entre os animais, independentemente do estímulo que tivesse empregado. Ao exame necroscópico observou nos animais testados uma hipertrofia das glândulas adrenais e presença de úlceras gástricas. Além disso, mostrou que, o comportamento dos animais em resposta a estes estímulos apresentava um mesmo padrão que viria a ser denominado, muito tempo após, por “comportamento doentio”, termo proposto por Benjamin Hart em (1988). Segundo Hans Selye, em 1936, essa síndrome era consequência de um processo orgânico adaptativo desencadeado por um estímulo aversivo externo, e a ele foi dado o nome de “Síndrome de Adaptação Geral”. Desta forma, constatou-se que o quadro estereotipado desencadeado por um estímulo externo tinha caráter adaptativo, demonstrando-se uma interação do sistema imune (SI) com o sistema nervoso (SN). Ao agente desencadeante da síndrome foi dado o nome de estressor e à síndrome de estresse (MASON, 1975).

Besedovsky et al. (1977), verificaram por meio da inoculação de lipopolissacarídeo (LPS) em ratos, a ocorrência de um aumento da liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e de corticosterona; estes fatos ocorriam de forma concomitante ou subsequente a alterações que também observaram na atividade elétrica de neurônios hipotalâmicos dos animais testados. Deste modo, mostrou-se de forma pioneira que após um desafio imune seguia-se uma alteração neurológica. Assim, e de outro ponto de vista, demonstrou-se a existência de relações bidirecionais imuno-neuroendócrinas ou de neuroimunomodulação (COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010).

A neuroimunomodulação é a ciência que analisa as relações bidirecionais existentes entre o sistema nervoso central (SNC) e o SI. Trata-se de área multidisciplinar que integra o conhecimento e o vê em forma de redes em que neurônios e células imunes interagem, modulando as respostas do organismo animal e humano tomados, portanto, como um todo (ADER, 2000; COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010).

Designa-se como estressor qualquer estímulo (ambiental, psicológico, imunológico ou comportamental) capaz de gerar alterações na homeostase, isto é, fisiológicas e comportamentais culminando com os sinais do estresse (CHROUSOS, 2009). A curto prazo, a reação a esse estímulo é um processo adaptativo; no entanto, se o estímulo persistir no tempo desenvolvem-se nos animais a ele submetido distúrbios orgânicos muitas vezes irreversíveis e graves (DHABHAR; MCEWEN, 1997; DHABHAR, 2014).

A ação do SNC sobre o SI têm sido associada principalmente às atividades do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e do sistema nervoso autônomo simpático (SNAS) (ZIEGLER; HERMAN, 2002). A relação intrínseca do hipotálamo com os centros superiores o torna um centro importante de regulação das respostas adaptativas frente aos estressores (HERMAN; CULLINAN, 1997). As estimulações aferentes ao SNC são integradas no hipotálamo, sendo posteriormente distribuídas a regiões específicas, ligadas às atividades do SNAS e eixo HPA (BERKENBOSCH et al., 1987; BASSO et al., 2004).

Mais especificamente, sabe-se ser a secreção dos glicocorticoides dependente da ativação do eixo HPA (HESS, 2002). O processo se inicia com a ativação de neurônios no núcleo paraventricular do hipotálamo, com consequente liberação de secretagogos de hormônios adrenocorticotróficos (ACTH), sendo os

principais hormônios liberados a arginina vasopressina (AVP) e o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) (ANTONI, 1986; WHITNALL, 1993). O estressor induz a liberação de CRH e AVP no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) para a circulação portal, que o leva à adenohipófise que, por sua vez, libera o ACTH (GILLIES; LINTON; LOWRY, 1982). O ACTH, chegando ao córtex da adrenal, induz a produção e a liberação de cortisol ou de corticosterona (ZIEGLER; HERMAN, 2002). Mais especificamente, de cortisol em humanos e de corticosterona em aves, animais de laboratório e outros.

A corticosterona e o cortisol modulam de forma intensa a atividade do sistema imune (DERIJK; STERNBERG, 1994; POST; REBEL; TER HUURNE, 2003; SHINI et al., 2008). Em especial modulam a transcrição gênica, impedindo translocações de fatores para o núcleo da célula imune, sendo o fator nuclear κB (NF- κB) o principal envolvido (PARK et al., 2007; FERREIRA et al., 2011). Esta interação com as células imunes diminui a transcrição de citocinas (IL-1, IL-13, IL-15, IL-6, IL-8 e TNF), influenciando diretamente o balanço dos linfócitos T auxiliares 1 e 2 (Th1 e Th2) (COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010); esta alteração reflete-se em outros tipos celulares, como por exemplo, nos leucócitos polimorfonucleares (heterófilos em aves) que, por sua vez, modulam a liberação de outras citocinas (BAEUERLE; BALTIMORE, 1996). Os glicocorticoides alteram o padrão de citocinas gerando uma diminuição da resposta imune celular (Th1) e estimulando da resposta imune humoral (Th2) (IWAKABE et al., 1998; ELENKOV; CHROUSOS, 1999). Outra característica importante da corticosterona e do cortisol sobre o sistema imune é a capacidade que eles apresentam de diminuir a quimiotaxia e a migração das células polimorfonucleares (neutrófilos/heterófilos, eosinófilos, basófilos) para os sítios de infecção (SHINI; KAISER, 2008).

Todo sistema neuroimune apresenta algum mecanismo regulador para ativação ou diminuição de sua atividade. A inibição do eixo HPA pode se dar por via dependente e independente de glicocorticoides (KELLER-WOOD E DALLMAN, 1984; HERMAN; CULLINAN, 1997). O *feedback* negativo do eixo HPA produzido pelos glicocorticoides se dá pela sua ligação a receptores de membrana existentes em neurônios centrais, desencadeando a ativação de genes responsáveis por inibir a transcrição do ACTH (KELLER-WOOD; DALLMAN, 1984; BREZINSCHKE et al., 1990). Uma via de inibição rápida da liberação de ACTH também pode ocorrer, sendo ela dependente dos níveis elevados de corticosterona na circulação

(KELLER-WOOD; DALLMAN, 1984; YOUNG; AKANA; DALLMAN, 1990; MCILROY et al., 1999).

Quando um animal é confrontado com um estímulo estressor, o sistema nervoso periférico faz a transdução do sinal inicial do estímulo até o SNC (córtex pré-frontal medial, hipocampo e/ou o *subiculum* ventral) (CULLINAN; HERMAN; WATSON, 1993); estes centros modulam a transferência da informação, “identificando” a significância do estímulo periférico, que tanto pode ser estimulatório como inibitório para a ativação do eixo HPA (HERMAN; DOLGAS; CARLSON, 1998). A possível ausência de significância da informação carregada ou o excesso de estimulação central, podem inibir o PVN via sinapses GABA-glutamato, que desencadeiam a excitação de projeções inibitórias ao PVN, diminuindo sua atividade (CANTERAS; SWANSON, 1992; HERMAN; DOLGAS; CARLSON, 1998; KISHI et al., 2000). Desta forma, faz-se um *feedback* negativo do eixo HPA, que tem origem na estimulação de neurônios provenientes de centros neurais superiores ao diencéfalo (RISOLD; SWANSON, 1996; ZIEGLER; HERMAN, 2002).

A rica inervação GABAérgica do núcleo paraventricular do hipotálamo, núcleo pré-óptico e núcleo da estria terminal sustenta a teoria da existência de um *feedback* negativo do eixo HPA, independente de glicocorticoides (CULLINAN; HERMAN; WATSON, 1993; ROLAND; SAWCHENKO, 1993). A presença de subunidades de receptores GABA-A no PVN corrobora com a teoria, dada a característica inibitória que este sistema tem na transmissão do impulso nervoso (CULLINAN, 2000).

Sabe-se que estímulos aferentes podem chegar ao SNC por intermédio de fibras do sistema nervoso autônomo simpático (SNAS), e do sistema nervoso autônomo parassimpático (SNAP) (NANCE; SANDERS, 2007). O SNAP, em especial, possui importante relação com mecanismos neuroimunes, que ocorrem no trato gastrointestinal (GRENHAM et al., 2011). Sua importância está na transmissão de estímulos aferentes viscerais, em especial aqueles provenientes dos intestinos, possível via de ativação do *feedback* negativo do eixo HPA (NANCE; SANDERS, 2007; CALEFI et al., 2016b). Além disso, mostrou-se que estímulos sensoriais desencadeados por estressores resultaram na ativação do SNAS, com consequente estimulação de terminais simpáticos periféricos e de outros localizados na medula da adrenal, promovendo a liberação das catecolaminas adrenalina e noradrenalina para a circulação (SZAFARCZYK et al., 1987).

As catecolaminas desencadeiam alterações fisiológicas preparando o animal para uma resposta de “luta ou fuga” (PACAK et al., 1995). Sabe-se que a cronicidade da estimulação catecolaminérgica produz “desregulação” endócrina, gerando alterações circulatórias e metabólicas (MILLER, 1998). Sabe-se, também, que as catecolaminas alteram a produção de citocinas, com diminuição de respostas pró-inflamatórias (IL-12, TNF- α , IFN- γ) e aumento das respostas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) (LICINIO; FROST, 2000; JOHNSON et al., 2005). Há estudos que demonstram ser a denervação noradrenérgica de linfonodos não apenas capaz de aumentar a inflamação como também de interromper o estímulo simpático para os órgãos linfáticos predispondo o desenvolvimento de infecções (LORTON et al., 1996; MOTOBU et al., 2003). Embora as aves não apresentem linfonodos, existe a possibilidade de que tal modulação ocorra em órgãos linfoides, como o baço (CALEFI et al., 2016a).

O eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (HHT) é outra via importante de ativação durante o estresse de caráter imunomodulatório (GLICK, 1984). Como se trata de uma via bidirecional, o sistema imune também é capaz de alterar as funções deste eixo. A citocina pró-inflamatória IL-1 suprime a liberação do hormônio estimulante da tireoide (TSH), enquanto que a liberação de IL-2 estimula o eixo HHT (CHANDRATILLEKE; HÀLA; MARSH, 1996). Os hormônios tiroxina (T_3), triiodotironina (T_4), hormônio liberador de tirotrofina (TRH) e o hormônio estimulador da tireóide (TSH) estimulam as células do sistema imune (MASHALY et al., 1998). Experimentos realizados em ratos têm demonstrado que a interação entre os eixos HHT e HPA pode gerar animais hipotireoídeos ou hipertireoídeos (KAMILARIS et al., 1991). Estas interações se tornam importantes no período produtivo de animais de produção, já que o ganho de peso está relacionado ao equilíbrio endócrino, principalmente aquele que envolve hormônios de caráter anabólico, como T_3 , T_4 e o hormônio do crescimento (GH) (MARSH; LAUTERIO; SCANES, 1984; HADDAD; MASHALY, 1990).

Sabe-se que o GH estimula a proliferação de linfócitos e timócitos, bem como a atividade citotóxica das células NK (GALA, 1991; AUERNHAMMER; STRASBURGER, 1995). A ligação deste hormônio aos receptores de linfócitos ativa a via do NF- κ B e a produção de um fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) que também têm efeitos na esfera imune (GEFFNER, 1997; BUUL-OFFERS; KOOIJMAN, 1998). Desta forma a produção de GH no hipotálamo torna-

se relevante para o estudo das relações neuroimunes, por ser o hipotálamo um dos principais centros do SNC envolvidos com a modulação da resposta ao estresse.

O estudo das relações neuroimunes em aves vem aumentando nas últimas décadas. Até alguns anos atrás, de forma idêntica ao que aconteceu com o ser humano, a maioria dos estudos focava apenas aspectos de neurologia ou de imunologia das aves, isto é, usavam abordagens isoladas ou isentas de interpretações neuroimunes. Pode-se dizer que um dos primeiros artigos a analisar a questão da neuroimunomodulação em aves tenha sido o de Marsh e Scanes (1994). Nesta revisão, os autores deram ênfase à discussão das relações neuroendócrinas existentes entre os hormônios tireoidianos, o hormônio do crescimento e os mediadores hormonais, assim como entre os corticosteroides gonadais e adrenocorticais com o sistema imune. Entretanto, um dos trabalhos pioneiros envolvendo o estudo das relações neuroimunes em aves, mesmo que não as tenha denominando diretamente desta forma, foi aquele de Glick em 1984.

De forma semelhante ao que ocorre em mamíferos, os hormônios tireoidianos, o hormônio do crescimento, os corticosteróides, a prolactina, os esteroides gonadais e seus mediadores, dentre outros, também modulam o sistema imune das aves (GLICK, 1991; HADDAD; MASHALY, 1991; SKWARLO-SONTA, 1992; TROUT; MASHALY, 1995; DUFFY et al., 2000; DEVICHE; CORTEZ, 2005). Sob condições estressoras, as aves liberam a corticosterona, por mecanismo semelhante ao descrito para os mamíferos, ocorrendo também nesta situação uma retenção de algumas populações de linfócitos no baço, o que produz o denominado “leucograma de estresse” (MASHALY; TROUT; HENDRICKS, 1993; MASHALY et al., 1998).

Hendricks et al. (1998, 1991) mostraram que a estimulação de linfócitos retirados do baço de aves por meio do CRH produziu liberação de ACTH por estas células; mostraram, ainda, que o sobrenadante proveniente da cultura foi capaz de estimular *in vitro* as células da adrenal a liberar. Idênticos resultados foram obtidos a partir da estimulação de macrófagos de aves por CRH (HENDRICKS et al., 1998).

Os sistemas nervoso e imune das aves estão diretamente relacionados; de fato, uma lesão produzida no hipotálamo de aves jovens comprometeu parâmetros imunes das mesmas como, por exemplo, a produção de linfócitos B e T (GLICK, 1984). A Bursectomia de aves gerou um aumento de peso das adrenais e dos testículos (GLICK, 1984). Além disso, mostrou-se que o timo e a bursa de Fabricius

são influenciados pelos corticosteroides, tendo sido o crescimento do timo também associado aos hormônios tireoidianos fatos que, em seu conjunto, mostram a existência de uma complexa relação neuroimuno-endócrina também em aves (GLICK, 1984).

Observou-se, que a utilização de corticoides também provoca alterações imunes nas aves. Assim, por exemplo, o tratamento de patos com dexametasona alterou a atividade de células NK periféricas, o que possivelmente foi associado à modulação da produção de eicosanoides pelos monócitos (FOWLES et al., 1993). Uma diminuição da imunidade humoral também já foi associada à aplicação de dexametasona em aves (FOWLES et al., 1993). Além disso, mostrou-se que a dexametasona modula populações de linfócitos $CD4^+CD25^+$ e de macrófagos quando de um desafio de aves por *Eimeria* spp. (CALEFI et al., 2016a).

A administração exógena em aves de hormônios provindos de outras espécies demonstra a conservação de alguns mecanismos neuroimunes na escala filogenética. Assim, a aplicação de GH humano em frangos com nanismo, aumentou o tamanho da Bursa de Fabricius e a resposta humoral dos mesmos. Mostrou-se, também, que a aplicação de hormônios tireoidianos humanos aumentou o peso do timo das aves (MARSH et al., 1984; MARSH; LAUTERIO; SCANES, 1984). Outros trabalhos mostraram que o fornecimento de hormônios tireoidianos humanos na ração aumentou o peso da bursa e do baço assim como o número de leucócitos esplênicos e o número de receptores para IL-2 nos esplenócitos (HADDAD; MASHALY, 1990; CHANDRATILLEKE; HÀLA; MARSH, 1996).

A bursa de Fabricius desempenha um importante papel no sistema imune das aves, principalmente na maturação de linfócitos B; nos últimos anos, sua interação com o sistema neuroendócrino tem sido objeto de muito estudo (GLICK, 1991; PINTEA; CONSTANTINESCU; RADU, 1967; ZENTEL; WEIHE, 1991). A bursectomia de aves com 1 dia de vida diminui a resposta *in vitro* das adrenais provenientes das mesmas ao ACTH; outro efeito associado à bursectomia foi a diminuição na produção de testosterona pelas células de Leydig (EL-FAR, MASHALY; KAMAR, 1994).

Gehad et al. (2002) mostraram que a aplicação de LPS em machos de aves imaturas sexualmente gerou um aumento nos níveis de corticosterona e uma diminuição de T_3 circulante. No entanto, este achado não foi observado quando se

aplicou previamente um antígeno T-dependente (BSA); ou seja, mostrou-se que os efeitos encontrados estavam ligados diretamente à resposta humoral.

Estudo realizado por Hu et al. (1993) em frangos obesos evidenciou uma alteração da atividade do eixo HPA capaz de modular a resposta autoimune tireoidiana; estes animais apresentaram uma resposta reduzida ou ausente à secreção de glicocorticoides, mesmo quando ela era estimulada por substâncias endógenas. Este efeito estava, possivelmente, associado a uma disfunção do eixo HPA (BREZINSCHKE et al., 1990). De fato, o hipotireoidismo já foi relacionado a uma disfunção do eixo HPA (KAMILARIS et al., 1991).

Uma análise da inervação dos órgãos linfóides reforça a noção de uma relação íntima entre o sistema nervoso e o sistema imune de aves (PINTEA; CONSTANTINESCU; RADU, 1967; CORDIER, 1969). A bursa de Fabricius possui inervação peptidérgica; peptídeos relacionados ao gene da calcitonina, taquicinas e neuropeptídeo Y são encontrados em vasos próximos que mantêm proximidade com a bursa. Demonstrou-se a presença de inervação simpática das artérias localizadas próximas aos folículos (ZENTEL et al., 1991). Ciriaco et al. (1995), utilizando técnicas de imunoistoquímica, identificaram neurônios noradrenérgicos e também de fibras reativas à acetilcolinesterase na região perivascular da bursa. Embora estes autores não tenham relatado a presença de fibras nervosas autonômicas na medula dos folículos da bursa, mostraram a presença de células semelhantes às dendríticas e de outras células reativas à acetilcolinesterase na região folicular (CIRIACO et al., 1995). Desta forma, quer nos parecer, fica caracterizado um envolvimento do sistema nervoso autonômico com as funções da bursa de Fabricius.

O desenvolvimento e a involução do timo e da bursa relacionam-se à produção de peptídeos derivados da pró-opiomelancortina, uma proteína precursora tanto do ACTH hipofisário como da β -endorfina (FRANCHINI; OTTAVIANI, 1999). Estes peptídeos e citocinas podem ser identificados no timo de aves a partir do 4º dia de vida; as concentrações destas substâncias aumentam com o avanço da idade da ave, estando este fato relacionado a modificações das populações de células endoteliais e interdigitantes do timo. O mesmo processo ocorre com as células do folículo da Bursa; neste caso mostrou-se que o processo de involução torna-se mais evidente a partir do 2º mês de vida, com a substituição das células constituintes da

Bursa por tecido fibroso (HENDRICKS; MASHALY, 1998; FRANCHINI; OTTAVIANI, 1999).

A denervação de aves intraovo empregando-se 6-hidroxidopamina (6-OHDA), uma neurotoxina que destrói terminações noradrenérgicas, foi capaz de melhorar a reposta imune primária das aves frente a um desafio com hemácias de carneiro (BC). A aplicação intraovo de 6-OHDA também diminui a expressão de citocinas *in vitro* durante ensaio de proliferação de linfócitos esplênicos, bem como diminui a responsividade dos linfócitos CD8+ esplênicos à injeção de noradrenalina nas aves (MOTOBU et al., 2003). Mostrou-se, neste sentido, que os níveis de noradrenalina estavam aumentados em pintinhos pré-imunizados com BC intraovo (BROWN-BORG; EDENS, 1992). Estas evidências confirmam ser a inervação simpática dos órgãos linfóides capaz de modular a atividade do sistema imune de aves.

Ensaio *in vitro* sobre a migração de leucócitos circulantes e produção de anticorpos, têm mostrado que as monoaminas (dopamina, serotonina e NOR) estimulam a produção de imunoglobulinas e a migração de células imunes (LUKAS, 1987; MCCORKLE ET AL., 1990; DENNO, 1994; MCCORKLE, 1994; MOTOBU et al., 2003).

Neste contexto, e por tudo quanto exposto, fica evidente que os sistemas de criação intensivos, tanto de frangos de corte quanto de aves de postura por gerar estímulos estressores, podem responder pela ocorrência de desregulações endócrinas diversas nos animais e, via de consequência, por queda acentuada dos índices de produção (CUNNICK; KOJIC; HUGHES, 1994; HECKERT et al., 2002; MASHALY et al., 2004).

3.3 NEUROIMUNOMODULAÇÃO E ESTRESSE TÉRMICO

Tanto o aumento como a diminuição da temperatura ambiente podem ser considerados estressores para os animais de produção. Neste sentido, o estresse pode ser entendido como o aumento ou a redução da temperatura ambiente acima do nível de conforto térmico do animal; a temperatura ambiente elevada ou diminuída é, pois, considerada um estressor.

O estresse por calor aumenta a liberação de corticosteroides nas fezes dos animais e o aumento da temperatura ambiente relaciona-se diretamente com o índice de mortalidade (TROUT; MASHALY, 1994). De fato, tem se observado que este estressor reduz parâmetros produtivos de conversão alimentar como, ganho de peso, número e qualidade dos ovos e qualidade da carcaça; estes achados foram interpretados como sendo reflexos diretos da magnitude do aumento da temperatura ambiente acima dos limites de conforto térmico (MASHALY et al., 2004; ROZENBOIM et al., 2007; SOLEIMANI et al., 2011; QUINTEIRO-FILHO et al., 2012b). Segundo alguns autores, nos atuais sistemas de criação de frangos de corte as variações de temperatura ambiental são mais importantes para o ganho produtivo de aves, que a densidade em que são mantidos os animais (DAWKINS; DONNELLY; JONES, 2004). Mesmo assim, como se verá adiante, a superpopulação também é agente estressor que tem efeitos relevantes sobre a homeostase, em especial, sobre a imunidade de aves.

A umidade relativa do ar também é outro importante fator a impactar na variação térmica, uma vez que quanto mais alta ela for, menor será a perda evaporativa de calor por parte das aves. Por outro lado, quando se associa baixa umidade relativa do ar com altas temperaturas ambientes os animais desidratam-se de forma muito rápida. É inquestionável que a associação da umidade relativa com a temperatura ambiente altera a sensação térmica dos animais. As aves mais jovens e as fêmeas são as que apresentam o maior desconforto às condições estressantes impostas pelas variações da temperatura aparente e da umidade ambientais (SWENSON; REECE, 2006).

Com a diminuição da perda evaporativa exige-se mais dos mecanismos não evaporativos de controle da temperatura das aves, que são: respiração, aumento do fluxo sanguíneo periférico e perda de calor por condução nas barbelas, crista, coxins plantares e contato do peito com a cama. A hiperventilação compensatória desencadeia alterações bioquímicas, que podem se refletir em outros sistemas. Desta forma, o aumento das concentrações de CO₂ circulante e a alcalose sanguínea são efeitos secundários induzidos pela hiperventilação (GLEESON; BRACKENBURY, 1984).

A manutenção da homeotermia é regulada por meio de sofisticado mecanismo de integração central no hipotálamo, acionado por informações aferentes relacionadas à temperatura. A informação integrada dos receptores de

calor e frio presentes nas vias nervosas e, até mesmo no hipotálamo, determinam os mecanismos compensatórios do controle da temperatura (ARANCIBIA et al., 1996b). Sabe-se, neste sentido, serem os receptores centrais de temperatura até dez vezes mais sensíveis que os periféricos às variações de temperatura e, ainda que os receptores periféricos informam o hipotálamo das flutuações térmicas ambientais (WIT; WANG, 1968; ROBERTS; MARTIN, 1974). Quando a resposta comportamental não supre as necessidades impostas pela elevação da temperatura, mecanismos fisiológicos são ativados para compensar o desbalanço térmico ocorrido (ETCHES et al., 2008). De modo geral, a resposta a um estímulo térmico é proporcional à quantidade de receptores acionados e à área do SNC estimulada, isto é, à quantidade e localização destes receptores (SIMON, 1981). Como já comentado, a ativação de receptores centrais de temperatura sobrepuja os estímulos provenientes da periferia; esta ativação põe em funcionamento todos os mecanismos compensatórios, independentemente da estimulação dos receptores periféricos (ARANCIBIA et al., 1996a).

Embora o estresse por calor reduza a ingestão de alimentos, como forma de reduzir o incremento calórico, o intestino do animal aumenta sua capacidade absorptiva de glicose presente na luz intestinal (GARRIGA et al., 2006). Mostrou-se que o estresse por calor, principalmente o estado hipertérmico, altera a permeabilidade intestinal (DOKLADNY; MOSELEY; MA, 2006), facilitando o transporte de toxinas bacterianas para o organismo, além de promover desequilíbrio hidroeletrólítico (LAMBERT et al., 2002).

O equilíbrio metabólico pode ser regulado por mecanismos integrantes do eixo HPA. O CRH, peptídeos relacionados ao CRH e os receptores de CRH foram incluídos no rol dos mecanismos que modulam o metabolismo energético (GILLIES; LINTON; LOWRY, 1982). Mostrou-se que vias nervosas que contêm estes peptídeos influenciam diretamente o equilíbrio térmico e, ainda que elas são desreguladas durante um estresse por calor (RICHARD; LIN; TIMOFEEVA, 2002; BALE et al., 2003; HILLHOUSE; GRAMMATOPOULOS, 2006; CHEN et al., 2012). Relatos têm indicado que a hipertermia produz lesão oxidativa celular, fato que exacerba os efeitos do estresse por calor e aumenta a chance de infecções ou lesões por microrganismos (OLIVER et al., 2012; ZHANG et al., 2013).

Star et al. (2007) mostraram que um estressor por calor (32°C por 23 dias) quando aplicado a linhagens puras de poedeiras produz efeito estimulante sobre a

resposta imune específica. Em outro contexto, Honda et al. (2015) demonstraram uma redução de linfócitos B na circulação após aplicação de estresse por calor e vacinação por Newcastle.

Calefi et al. (2014) verificaram que o estresse por calor a longo prazo reduziu a lesão intestinal produzida por uma infecção pelo *C. perfringens*. Por sua vez, Calefi et al. (2016) confirmaram a existência da redução de inflamação heterofílica e de lesão intestinal nos animais estressados por calor em um modelo de NE; estes autores caracterizaram ser o meio fluído tioglicolato (MFT) e/ou infecção por *C. perfringens* capazes modular o eixo cérebro-intestino de frangos de corte.

Tsiouris et al. (2015a,b), verificaram, em um modelo experimental de NE que empregou co-infecção por *C. perfringens* e *Eimeria* spp., que o estresse por frio e a alta densidade populacional predispõem o desenvolvimento da doença. De fato, o número de unidades formadoras de colônias (c-fos) aumentou no ceco destes animais estressados; mais que isto, estes autores observaram a ocorrência de alterações bioquímicas no ambiente intestinal das aves quando elas eram estressadas por frio ou estão mantidas em superpopulação. De forma semelhante, Gomes et al. (2014) verificaram, em nossos laboratórios, que a alta densidade populacional diminuiu a capacidade fagocítica de macrófagos e aumentou uma infecção por *Salmonella* sp. em frangos de corte. Mostramos, ainda, que um estresse por calor aumentou uma infecção de *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte (QUINTEIRO-FILHO et al., 2012a). Observamos, também, que ocorre uma maior migração destas bactérias para órgãos linfóides de animais estressados. Além disso, Quinteiro-Filho et al. (2012b) verificaram que o estresse agudo por calor induziu quebra da barreira intestinal levando a inflamação intestinal discreta.

De forma interessante, Borsoi et al. (2015) verificaram que frangos estressados por frio nos primeiros dias de vida têm, quando adultos, aumento da invasibilidade de *Salmonella* Heidelberg a partir do intestino para a circulação sistêmica e consequentemente diminuição da eliminação das bactérias a partir do tecido infectado. Além disso, mostraram que a infecção por *Salmonella* ativou o eixo HPA, aumentando os níveis plasmáticos de NOR das aves (BORSOI et al., 2015). Curiosamente, resultados semelhantes foram encontrados em ratos submetidos ao estresse por frio (PARDON; MA; MORILAK, 2003).

Segundo Banfield, Doeschate e Forbes (1998), um estresse crônico por calor em frangos de corte reduz a eliminação de oocistos de *Eimeria* spp. Os achados

apresentados no capítulo 6 e 8 desta Tese confirmam que o estresse por calor, mesmo quando aplicado de forma intermitente é capaz de reduzir a infecção por *Eimeria* spp. Este fato sugere que o estresse por calor aplicado de forma intermitente ou contínua produzem uma resposta semelhante à de um estresse crônico. As variações quanto à infecção foram relacionadas ao desbalanço de citocinas padrão Th1/Th2 auxiliando a resposta orgânica à *Eimeria* spp. e até mesmo favorecendo um comportamento errático das cepas utilizadas (Capítulo 8). No entanto, há que ressaltar que o estresse por calor aumentou o número de ufc's de *C. perfringens* no ceco dos frangos de corte, o que indica um favorecimento do desenvolvimento da NE, como já relatado em outro local (TSIOURIS et al., 2015a).

Os dados da literatura acima apresentados indicam ser o estresse térmico por calor ou frio capazes de modular tanto a atividade do SNC como de um processo infeccioso; de igual forma, um processo infeccioso pode modular a atividade do SNC e o comportamento dos animais. No entanto, diferenças nos agentes etiológicos e no tipo, intensidade e duração do estresse podem produzir respostas diferentes nos eixos HPA-intestino e neuroimune das aves e, também, na intensidade e gravidade da infecção. Quer nos parecer, assim, que estudos de neuroimunomodulação que envolvam processos infecciosos, imunes, estresse térmico e comportamento de aves sejam necessários para uma melhor compreensão da fisiopatologia e do manejo de alguns patógenos de interesse na produção avícola.

4 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO POR CALOR SOBRE AS ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS E NA ADESÃO BACTERIANA INTESTINAL EM MODELO EXPERIMENTAL DE ENTERITE NECRÓTICA AVIÁRIA ¹

4.1 INTRODUÇÃO

O Bem-estar animal é considerado um componente importante da produção avícola (ZHAO et al., 2013). O declínio no bem-estar de um animal, particularmente quando associado a condições estressoras, quebra a homeostase levando a alterações fisiopatológicas (YANG et al., 2011). Portanto, uma maior compreensão dos efeitos do estresse sobre a saúde animal tem sido procurada em vários campos científicos, incluindo-se, entre outros, a neuroimunomodulação, uma ciência que estuda as complexas interações bidirecionais existentes entre o sistema nervoso e o sistema imune (DEL REY et al., 2012).

O calor é um dos estressores ambientais mais importantes na produção de aves. Mostramos que frangos de corte submetidos a estresse térmico por longo prazo apresentavam diminuição nos parâmetros de desempenho, diminuição da imunidade e aumento do índice de lesões intestinais; estes efeitos foram atribuídos à ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (QUINTEIRO-FILHO et al., 2012b). Além disso, o estresse por calor tem sido associado a uma diminuição da atividade imune intestinal com prejuízo à morfologia intestinal, seguido por maior invasão e migração de bactérias patogênicas por meio do epitélio intestinal (BURKHOLDER et al., 2008; DENG et al., 2008; QUINTEIRO-FILHO et al., 2012b; VERBRUGGHE et al., 2012).

Experimentos conduzidos com o *Clostridium perfringens* tipo A mostraram que, em casos de uma infecção experimental em que as bactérias foram administradas por via oral, não se observaram sinais clínicos indicativos de NE quando os animais foram mantidos em um ambiente controlado (HELMBOLDT; BRYANT, 1971; AL-SHEIKLY; TRUSCOTT, 1977; COWEN et al., 1987; CRAVEN,

¹ Traduzido e adaptado de: CALEFI, A. S.; HONDA, B. T. B.; COSTOLA-DE-SOUZA, C.; DE SIQUEIRA, A.; NAMAZU, L. B.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; FONSECA, J. G. da S.; ALOIA, T. P. A.; PIANTINO-FERREIRA, A. J.; PALERMO-NETO, J. Effects of long-term heat stress in an experimental model of avian necrotic enteritis. **Poultry Science**, v. 93, n. 6, p. 1344–1353, 2014.

2000; WILLIAMS et al., 2003). No entanto, as combinações da infecção bacteriana com alimentação desbalanceada, co-infecção com coccidia e/ou aplicação de estressores ambientais, têm sido relatadas como sendo capazes de desencadear enterite necrótica (HELMBOLDT; BRYANT, 1971; AL-SHEIKLY; TRUSCOTT, 1977; COWEN et al., 1987; CRAVEN, 2000; WILLIAMS et al., 2003).

Poucos estudos examinaram a relação entre estresse térmico e infecções intestinais causadas por bactérias anaeróbias toxigênicas sobre a patogênese de doenças aviárias intestinais, em particular, os efeitos do estresse térmico sobre o processo infeccioso. Assim, para investigar os possíveis efeitos de estressores no desenvolvimento enterite necrótica aviária, foram avaliados os efeitos do estresse térmico aplicado a longo prazo em frangos de corte infectados experimentalmente com cepa patogênica de *C. perfringens* tipo A.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Animais

Frangos de corte com um dia de vida foram alojadas em salas climatizadas nas dependências da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil. Um total de 60 frangos de corte machos (Cobb 500[®]) foram mantidas em câmaras isoladoras (Alesco, São Paulo, Brasil), contendo filtros de ar com alta eficiência na separação de partículas (HEPA), desde o primeiro (ED1) até o último dia experimental (ED21). As aves receberam água *ad libitum* e foram alimentadas como descrito no item 3.2.3. A umidade relativa do ar foi monitorada e controlada (em não menos que 45%). Os animais foram mantidos e utilizados de acordo com as orientações e aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil (n° 2570/2012).

4.2.2 Formação de grupos e estresse por calor

Do 1º a 13º dia de vida (ED1 ao ED13), as aves foram mantidas nas temperaturas ambientais recomendadas para a espécie ($33 \pm 1^\circ\text{C}$ do ED1 ao ED7 e $28 \pm 1^\circ\text{C}$ do ED7 ao ED13). No ED1, os frangos de corte foram aleatoriamente e igualmente divididos em seis grupos de 10 animais cada, sendo denominados de: grupo controle (C); grupo tioglicolato (T); grupo infectado por *C. perfringens* (I); grupo controle estressado por calor (C/HS35); grupo tioglicolato estressado por calor (T/HS35) e grupo infectado por *C. perfringens* e estressado por calor (I/HS35). Os tratamentos dos animais dos diferentes grupos foram feitos por via oral e encontram-se descritos na Quadro 1. a Tabela 1 trata-se de um Quadro

Quadro 1 - Apresentação esquemática dos tratamentos alimentares das aves dos diferentes grupos experimentais

Grupo	Estresse por Calor ⁽²⁾	Tratamento alimentar ⁽²⁾
C	-	
T	-	Meio de cultura caldo tioglicolato
I	-	Meio de cultura caldo tioglicolato com <i>C. perfringens</i>
C/HS35	+	
T/HS35	+	Meio de cultura caldo tioglicolato
I/HS35	+	Meio de cultura caldo tioglicolato com <i>C. perfringens</i>

Fonte: (CALEFI et al., 2014)

Nota: (2) do ED14 ao ED21. (-) ausência. (+) presença.

A partir do ED14 ao ED21, os frangos dos grupos não estressados pelo calor (C, T e I) foram mantidos a uma temperatura ambiente de $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Os frangos dos grupos estressados pelo calor (C/HS35, T/HS35 e I/HS35) foram mantidos a uma temperatura ambiente de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante todo o dia do ED14 ao ED21. No ED21, os animais de todos os grupos foram eutanasiados em câmaras contendo CO_2 , para necropsia e colheita dos tecidos.

4.2.3 Protocolo de infecção e preparo do inóculo de *Clostridium perfringens*

Foi utilizada uma cepa patogênica de *C. perfringens* tipo A (cepa CP8.2), com genótipo para produção das toxinas α e TpeL ($\beta 2$ e NetB negativo). A toxinotipagem foi feita de acordo com método proposto por Meer e Songer (1997) e Coursodon et al. (2012). Esta cepa bacteriana foi mantida em glicerol a -80°C . O inóculo foi preparado seguindo-se o procedimento descrito por Cooper e Songer (2010). Resumidamente, o inóculo foi preparado por dois cultivos alternados em meio de cultura de carne cozida (CMM, Becton, Dickinson and Company) e meio de cultura em caldo tioglicolato (MFT, Becton, Dickinson and Company, MD, EUA) contendo extrato de levedura a 2% (Becton, Dickinson and Company). Todas as culturas foram mantidas em anaerobiose a 37°C por 15 horas. O número de unidades formadoras de colônias (cfu) em cada inóculo foi determinado diariamente a partir do ED15 e até o ED20 por contagem de ufc por plaqueamento em meio de cultura ágar sangue de inóculo previamente submetido a diluições em série. As bactérias (1×10^8 ufc/mL) foram oferecidos para os animais misturadas à ração (v/v; meio de cultura/ração) em comedouros tipo calha de alumínio; as misturas e inóculo oferecidos para os frangos foram preparadas diariamente. Este método de alimentação, adaptado a partir do protocolo descrito por Cooper e Songer (2010). Os animais do grupo controle (C e C/HS35) foram alimentados apenas com ração comercial sem bactérias, farinha de peixe e meio de cultura caldo tioglicolato.

Conforme apresentado na Tabela 1, este protocolo experimental envolveu a utilização de alimentos formulados com uma alta concentração de proteína bruta e proteína animal; esta suplementação foi descrita como capaz de desbalancear o microambiente intestinal e, conseqüentemente, predispor as aves ao desenvolvimento da infecção pelo *C. perfringens* (AL-SHEIKLY; TRUSCOTT, 1977; WILLIAMS et al., 2003). No entanto, deve-se notar que o meio de cultura caldo tioglicolato em que as bactérias foram cultivadas e administradas é uma substância quimiotática *per se*. Esta substância é utilizada para estimular a migração de células mononucleares para tecidos de mamíferos (NATHAN; ROOT, 1977; SEGAL et al., 2002). Assim, o caldo tioglicolato também foi testado neste estudo (grupos T e T/HS35).

Mais especificamente, durante os primeiros 7 dias de vida, os frangos de todos os grupos foram alimentados com uma ração para aves contendo 24% de proteína bruta (PB), sem antimicrobianos (todos os grupos). Do ED8 ao ED14, os animais do grupo T, T/HS35, I e I/HS35 receberam uma alimentação com alto teor de proteína (28% PB) misturado com farinha de peixe (55% PB) em uma proporção de 1:1 (v/v). A partir do ED15 ao ED21, o meio de cultura contendo a cepa patogênica de *C. perfringens* tipo A (grupos I e I/HS35; 1×10^8 ufc/mL) ou o meio de cultura caldo tioglicolato (grupos T e T/HS35) foram misturados na ração na proporção 1:1 (v/v), e fornecida aos frangos. As concentrações finais de bactérias foram de cerca 1×10^4 ufc/g de ração. Embora diferente em consistência do usual, a ração, mais o MFT com ou sem bactérias foi ingerida normalmente pelos animais; o consumo diário de ração misturado ao meio de cultura foi de aproximadamente 100 g por animal, um valor não estatisticamente diferente do consumo de ração dos animais dos grupos controle (grupos C e T).

4.2.4 Avaliação macroscópica intestinal

No ED21, realizou-se necropsia de todos os frangos de corte imediatamente após a eutanásia. Porções do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) foram separadas e seccionados para exame macroscópico de toda a mucosa. Secções com 2,5 cm de comprimento da flexura duodenal inferior, jejuno (a região intermediária entre a extremidade do duodeno e divertículo de Meckel) e íleo (a região média entre divertículo de Meckel e junção ileocecal) foram colhidas para exame histopatológico. As mesmas regiões foram coletadas de todos os animais, independentemente da presença de alterações macroscópicas.

O aspecto macroscópico da mucosa intestinal dos animais infectados foi classificado utilizando-se um sistema de escore lesional conhecido por sua confiabilidade e repetibilidade em investigações em patologia (GIBSON-CORLEY; OLIVIER; MEYERHOLZ, 2013). Este sistema de escore baseia-se unicamente na visualização macroscópica do intestino; as inferências relacionadas com necrose e inflamação foram feitas mediante avaliação microscópica. A Quadro 2 descreve o sistema de escores utilizado. Dois patologistas que desconheciam a afiliação dos

grupos experimentais examinaram os intestinos; encontrou-se uma alta correlação positiva entre os escores definidos por estes patologistas.

Quadro 2 - Critério de determinação dos escores de lesão macroscópicas do intestine delgado

Escore	Descrição
0	Sem achados patológicos
+1	Parede intestinal adelgada e flácida que não tende a retornar à posição anterior após excisão. Serosa avermelhada que se destaca quando manipulada. Mucosa com placas focais avermelhadas, esbranquiçadas ou negras. Presença de conteúdo descamativo fibrinoso (+) no lúmen intestinal. Presença de distensão gasosa (+).
+2	Intestino adelgado e flácido que não tende a retornar à posição anterior após excisão. Serosa avermelhada a arroxeadada que se destaca quando manipulada. Mucosa com placas multifocais avermelhadas, esbranquiçadas ou negras. Presença de conteúdo descamativo fibrinoso (++) no lúmen intestinal. Presença de distensão gasosa (++).
+3	Intestino adelgado, flácido e friável que não retorna à posição anterior após excisão. Serosa avermelhada a arroxeadada que se destaca ao toque. Mucosa com placas multifocais a coalescentes avermelhadas, esbranquiçadas ou negras. Presença de conteúdo descamativo fibrinoso (+++) no lúmen intestinal. Presença de distensão gasosa (+++).
+4	Intestino adelgado, flácido e friável que se rompe durante manipulação. Pontos de destacamento da serosa e coloração avermelhada a arroxeadada tendendo ao preto difusp. Mucosa com placas difusas esbranquiçadas ou negras. Presença de conteúdo descamativo fibrinoso (+++++) no lúmen intestinal. Presença de distensão gasosa (++++).

Fonte: (CALEFI, 2016)

4.2.5 Avaliação histopatológica

Os tecidos coletados durante a avaliação macroscópica foram fixados em formol a 10% durante 48 horas; subsequentemente, os materiais foram embebidos em parafina segundo procedimento padrão de nossos laboratórios para inclusão de

tecido. Cortes transversais de 5 µm foram corados com HE; separadamente, foram realizadas coloração por ácido periódico de Schiff (PAS), Gram e Alcian Blue. O exame histopatológico foi realizado por microscopia óptica sob os aumentos de 40x, 200x e 400x.

A determinação da produção de mucina foi realizada por análise qualitativa levando-se em consideração os animais do grupo C como apresentando dados de normalidade. Foi feita uma comparação entre os dados dos animais estressados e não estressados. As técnicas histoquímicas utilizadas: PAS para o muco neutro e Alcian Blue para muco ácido, permitem inferir diferenças na produção desses mucos pela coloração magenta-vermelho (PAS) e a coloração azul (Alcian Blue), respectivamente.

Para o diagnóstico das lesões e comparação dos achados histopatológicos entre os diferentes grupos toda a área de três seções intestinais transversais por porção intestinal (duodeno, jejuno e íleo) foram avaliadas quanto à necrose, inflamação (infiltrado de células polimorfonucleares e mononuclear), a fusão de vilos, congestão, edema e hemorragia. Cada tipo de lesão foi classificado como sendo leve (escore 1), moderado (escore 2) e marcante a grave (escore 3) para necrose, inflamação, congestão, edema e hemorragia (DIAB et al., 2012). A fusão das vilosidades também foi pontuada como (1): inferior a 3 fusões por secção histológica; (2): entre 3 a 6 vilosidades fusionadas por secção histológica; e (3): mais de 6 vilosidades fusionadas por secção histológica. A pontuação do total de lesões por animal foi realizada pela soma dos escores de lesões observadas por porção intestinal.

As seções intestinais submetidas à coloração de Gram foram avaliadas para determinação de bacilos pleomórficos Gram positivos (*C. perfringens*). Resumidamente, cada porção intestinal corada pelo método de Gram, foram classificadas como (1): presença difusa de bastonetes Gram-positivos na camada de muco que reveste as vilosidades, sem agregados bacterianos associados à necrose tecidual; (2) distribuição difusa de bastonetes Gram-positivos na camada de muco que reveste as vilosidades com agregados bacterianos multifocais, associados com as regiões de necrose e (3): difusa distribuição de bastonetes Gram-positivos na camada de muco que reveste as vilosidades com presença de agregados bacterianos multifocais a coalescentes associados com as regiões de necrose tecidual.

Dois patologistas que desconheciam filiação dos grupos examinaram os preparados histológicos para a determinação dos escores. Foi encontrada uma concordância positiva entre suas avaliações independentes.

4.2.6 Identificação bacteriana

Os conteúdos do duodeno, jejuno e íleo foram diluídos em solução de tampão fosfato (PBS, pH 7,2, 0,01 M) e plaqueados em ágar BHI contendo 0,5% de extrato de levedura e 5% de sangue bovino citratado. Os conteúdos diluídos foram incubados sob condições anaeróbias a 37 °C durante 48 horas. Após a incubação, as colônias de bactérias dentro de cada grupo de galinhas foram avaliadas pelo tipo de hemólise do meio de cultura e pela morfologia da colônia. Não se determinou as ufc's destas amostras. Uma análise de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com as fezes das aves dos lotes de frangos antes da infecção pelo *C. perfringens*; todos os resultados obtidos foram negativos para *C. perfringens* tipo A e cepas contendo gene TpeL.

4.2.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA). Todos os dados obtidos foram não paramétricos. Assim, empregou-se análise de Kruskal-Wallis seguida pelo teste de Mann-Whitney U para comparações entre grupos. As diferenças foram consideradas significantes para $P \leq 0,05$. Os dados são apresentados como porcentagem das pontuações medianas e valores máximos e mínimos.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Avaliação macroscópica e determinação de escores de lesão intestinal

Não foram observadas alterações macroscópicas nos intestinos das aves dos grupos controle com ou sem estresse por calor (grupos C e C/HS35). No entanto, observou-se uma coloração mais avermelhada das mucosas dos animais que ingeriram MFT e não foram infectados (grupos T e T/HS35) quando comparada com aquelas dos animais dos grupos controles (C e C/HS35).

A tabela 3 mostra os escores atribuídos às lesões macroscópicas. Como se depreende da análise, as lesões macroscópicas encontradas nos intestinos das aves dos diferentes grupos não foram significativamente diferentes (duodeno: $P = 0,4726$; jejuno: $P = 0,2698$; íleo: $P = 0,1698$). No entanto, parece relevante destacar que todos os frangos dos grupos não-estressados apresentaram maior escore de lesão no jejuno (escore 3), valor não encontrado nos frangos dos demais grupos que apresentaram escores iguais ou menores do que (2) (Quadro 3).

Quadro 3 - Escores de lesão intestinal macroscópica em animais infectados com *C. perfringens* (I) ou infectados e estressados (I/HS35)

Porção intestinal	I Mediana (Max/Min)	I/HS35 Mediana (Max/Min)
Duodeno	<u>2.5</u> 3/1	<u>2</u> 3/1
Jejuno	<u>2.0</u> 3/1	<u>1</u> 2/1
Íleo	<u>0</u> 1/0	<u>1</u> 1/0

Fonte: (CALEFI, 2016)

Nota: Os dados correspondem à mediana e valores máximos e mínimos (Max/Min) dos escores macroscópicos dos animais ($n = 10/\text{grupo}$). Não foram encontradas diferenças estatísticas significantes utilizando o teste de Mann-Whitney.

4.3.2 Avaliação microscópica intestinal

Como mostrado na Tabela 4, o intestino delgado dos frangos dos grupos T e T/HS35 apresentaram uma tendência para maior fusão de vilos, agregados de células linfoides associados à mucosa (GALT) e infiltrados inflamatórios na lâmina própria em comparação com dados dos frangos dos grupos controle (C e C/HS35). Observou-se aumento do número de heterofilos infiltrados na lâmina própria e nas vilosidades do duodeno e do jejuno dos animais do grupo infectado e não estressado ($P < 0,05$). Graus leves a moderados de enterite e proliferação linfoplasmocítica foram observados nos frangos dos grupos T e T/HS35 sem diferenças significantes entre estes grupos. A inflamação linfoplasmocítica considerada leve a moderada nos animais do grupo I/HS35, sendo esta estatisticamente diferente ($P < 0,05$) daquela observada nos animais não estressados (grupo I) que apresentaram inflamação linfoplasmocítica grave (Tabela 1). O infiltrado inflamatório presente nos intestinos dos frangos dos grupos de controle (C e C/HS35) foi estatisticamente semelhante (Tabela 1).

O estresse por calor também aumentou a produção de mucina neutra (PAS) em todas as porções intestinais dos frangos (grupos T/HS35 e I/HS35; Figura 1) quando comparada à dos animais não estressados (grupos T e I). Observou-se que, apesar do aumento da produção de muco neutro, não havia manutenção da camada de muco que revestia a superfície das vilosidades nos animais estressados (grupos T/HS35 e I/HS35) fato este que foi acompanhado por descamação epitelial. Os animais dos grupos estressados (grupos T e I) apresentaram camada de muco preservada em torno das vilosidades, acompanhada por redução da descamação do epitélio intestinal (Figura 1). A coloração de Gram mostrou a presença de bacilos Gram positivos pleomórficos na camada de muco que cobria as vilosidades dos animais não estressados (grupo I). Esta camada de muco estava menor nos animais estressados (grupo I/HS35), resultando este fato em um pequeno número de bacilos Gram-positivos encontrados no epitélio do duodeno ($P < 0,05$) e do jejuno ($P < 0,05$), quando comparado aos dos grupos não estressados (I; Figura 1). Não foram encontradas diferenças na produção de muco ácido entre os grupos.

Tabela 1 - Porcentagem de escores para lesões histológicas encontradas no duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte de todos os grupos experimentais

	Grupo	Necrose (%)			Inflamação (%poli / %mon)			Fusão de vilos (%)			Congestão (%)			Edema (%)			Hemorragia (%)		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Duodeno	C	-	-	-	- /10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C/HS35	-	-	-	- /40	-	-	-	-	-	20	-	-	30	-	-	-	-	-
	T	60	-	-	- /30	- /10	-	20	-	-	60	-	-	10	-	-	-	-	-
	T/HS35	50	-	-	- /50	- /20	-	20	-	-	30	-	-	60	-	-	-	-	-
	I	10	60	30	40/20	30/50	20/30	20	30	40	50	20	10	30	70	-	30	-	-
	I/HS35	50*	20*	10*	30*/60	20*/20	-* /20	30*	10*	20*	60	10	-	80	20	-	20	-	-
Jejuno	Grupo																		
	C	-	-	-	- /30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C/HS35	-	-	-	- /20	-	-	-	-	-	30	-	-	20	-	-	-	-	-
	T	40	-	-	20/60	-	-	30	-	-	70	-	-	80	-	-	-	-	-
	T/HS35	30	-	-	- /40	-	-	30	-	-	40	-	-	90	-	-	-	-	-
	I	50	40	10	60/20	20/60	10/20	20	10	-	20	60	20	60	40	-	30	-	-
Íleo	I/HS35	30*	20*	-*	10*/40	30*/30	-*/20	30	10	-	40*	10*	-*	70	10	-	10	-	-
	Grupo																		
	C	-	-	-	- /20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	C/HS35	-	-	-	- /10	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-
	T	-	-	-	- /20	- /10	-	10	-	-	50	-	-	20	-	-	-	-	-
	T/HS35	-	-	-	- /30	-	-	-	-	-	30	-	-	-	-	-	-	-	-
	I	-	-	-	- /40	- /20	-	10	-	-	80	10	-	40	-	-	-	-	-
	I/HS35	-	-	-	- /70	-	-	10	-	-	40*	-*	-*	-	-	-	-	-	-

Fonte: (CALEFI et al., 2014)

Nota: Para necrose, inflamação, congestão, edema e hemorragia: -, não observado; 1 discreto; 2, moderado; 3 grave; para fusão de vilos: 1, menos de 2 vilos fusionados; 2, de 3 a 6 vilos fusionados; 3, acima de 6 vilos fusionados; poli, infiltrado de células polimorfonucleares; mon, infiltrado de células mononucleares. *P<0,05 comparado aos animais do grupo I (teste U de Mann-Whitney).

A morfologia das bactérias encontradas nos locais de infecção dos frangos de corte dos grupos I e I / HS35 foi consistente com a do *C. perfringens*. Os animais dos grupos controles (grupos C, C/HS35, T e T/HS35) não apresentaram bactérias com esta morfologia junto às vilosidades intestinais.

Figura 1 - Efeitos da infecção e/ou estresse por calor sobre o número de bactérias observadas na histologia do duodeno, jejuno e íleo dos frangos de corte

Fonte: (CALEFI et al., 2014)

Legenda: A – Duodeno; B – Jejuno; C – Íleo; I – animais infectados por *C. perfringens*; I/HS35 - animais infectados por *C. perfringens* e estressados por calor. * $P < 0.05$ (n = 10/grupo).

Um infiltrado inflamatório polimorfonuclear marcante foi observado nas porções intestinais dos animais infectados e não estressados (grupo I) em comparação aos estressados (I/HS35). Observou-se um grave e estatisticamente significativo aumento da necrose no duodeno ($P = 0,0128$) e no jejuno, $P = 0,0356$, mas não no íleo ($P > 0,05$) dos animais dos grupos infectados (I e I/HS35). Uma análise dos dados da tabela 4, mostrou a existência de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos I e I/HS35 para a congestão do jejuno e íleo ($P < 0,05$), bem como para a fusão das vilosidades no duodeno ($P < 0,05$). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os animais dos grupos infectados estressados comparados aos infectados não estressados para hemorragia e edema em todas as porções do intestino delgado ($P > 0,05$). Esses achados foram mais evidentes no duodeno e jejuno destes animais (Tabela 1). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os animais dos grupos T e T/HS35 para necrose, inflamação, fusão das vilosidades, congestão, edema e hemorragia. Os frangos de corte do grupo C e C/HS35 apresentaram apenas edema e congestão discreta da mucosa, não se encontrando alterações dignas de nota nos animais do grupo C.

A Figura 2 representa a soma de todos os escores de lesões microscópicas observados nos frangos dos diferentes grupos. Como representado nesta figura, a ingestão do caldo tioglicolato induziu lesões intestinais nos frangos de corte dos

grupos T e T/HS35; no entanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os dados destes grupos. Verificou-se, também, que o estresse por calor diminuiu a mediana dos escores totais de lesão microscópica encontrados nos animais infectados e estressados (I/HS35) quando comparados com dados dos frangos não estressados (I); no entanto, diferenças estatisticamente significantes não foram encontradas entre esses dois grupos (grupos I e I/HS35) em consequência da maior variabilidade dos dados obtidos.

Figura 2 - Somatória total dos escores de lesão microscópicos no duodeno, jejuno dos frangos de corte

Fonte: CALEFI et al., 2014)

Legenda: A – Duodeno; B – Jejuno; C – Íleo; animais estressados por calor (C/HS35, T/HS35, I/HS35) e não estressados (C, T e I). Diferentes letras sobre as colunas indicam diferenças significantes em $P < 0,05$ (Teste de Kruskal-Wallis e teste U de Mann Whitney; $n = 10$ /grupo).

Fonte: (CALEFI, 2016)

4.3.3 Identificação bacteriana

O *C. perfringens* não foi encontrado por cultivo microbiológica de ágar de sangue no conteúdo do duodeno, jejuno e íleo dos animais que não foram infectadas (C C/HS35, T e T/HS35). Em todos os animais dos grupos infectados estressados ou não, foi isolada bactéria no conteúdo do duodeno, jejuno e íleo, colônias estas compatíveis com as de *C. perfringens*. Estes isolados foram posteriormente confirmados como sendo *C. perfringens* do tipo A pelo método de PCR multiplex.

4.4 DISCUSSÃO

A maior parte dos modelos experimentais de enterite necrótica aviária utiliza uma combinação de infecção bacteriana com infecção parasitária (coccídeas). Esta co-infecção é conhecida por facilitar o estabelecimento do *C. perfringens* e o desenvolvimento de uma infecção clínica (AL-SHEIKHLY; AL-SAIEG, 1980; SHANE et al., 1985). Cooper e Songer (2010) propuseram um modelo experimental de infecção por *C. perfringens* que não utiliza a co-infecção. Esta abordagem pareceu-nos a priori, ser ideal para o presente estudo em que se investiga os efeitos do estresse térmico sobre uma infecção única por *C. perfringens*. Assim, o método proposto por Cooper e Songer (2010) foi aplicado neste estudo, com pequenas adaptações; mais especificamente, foi necessário aumentar o período experimental de 19 dias para 21 dias. Este modelo provou ser adequado, porque sinais de NE foram observados em todos os animais infectados (I e I/HS35).

O efeito inflamatório potencial do tioglicolato e suas ações irritantes na mucosa intestinal no entanto, foi claramente observado neste trabalho, um fato que concorda com dados reportados em outras condições experimentais (NATHAN; ROOT, 1977; SEGAL et al., 2002). Exames macroscópicas e histológicas revelou enterite discreta nos frangos dos grupos T e T/HS35. De fato, o tioglicolato é um agente inflamatório *per se* capaz de induzir dano tecidual. No decurso deste estudo, este tipo de lesão epitelial era desejável, pois facilitaria a proliferação do *C. perfringens* na mucosa intestinal, assim como a infecção bacteriana e a produção de toxina (CRAVEN, 2000; COOPER et al., 2010). Além disso, tem sido relatado que lesões induzidas por irritação que prejudique as barreiras físicas intestinais é capaz de produzir uma condição que também é desejável no contexto do presente estudo experimental (CRAVEN, 2000; COOPER et al., 2010).

Alterações epiteliais, tais como as aqui descritas nos frangos infectados dos grupos (I e I/HS35) têm sido associadas a desequilíbrios na microbiota intestinal comensal (LUTGENDORFF; AKKERMANS; SÖDERHOLM, 2008). Nesta situação, há maior probabilidade de concorrência entre as bactérias patogênicas (por exemplo, *Clostridium*) e bactérias comensais para adesão e proliferação na mucosa (GRENHAM et al., 2011).

Em nosso estudo, os animais foram alojados em câmaras isoladoras durante todo o período experimental; assim, os animais permaneceram protegidos contra contaminantes externos. Os frangos utilizados não foram desafiados com uma diversidade de bactérias do ambiente, tal como pôde ser confirmado pela análise microbiológica realizada nas fezes. De fato, apenas o *C. perfringens* foi encontrado no conteúdo intestinal das aves infectadas (I e I/HS35) no ED21. Esta condição contrasta com as várias bactérias anaeróbicas que se sabe existirem em animais criados em condições de produção industriais normais (SINGH et al., 2012). Animais livres de patógenos (SPF) foram caracterizados por apresentar menor ou incompleta maturação do sistema imunológico, anomalias do sistema nervoso central e problemas de absorção intestinal (MCCRACKEN; LORENZ, 2001). Na presente série de experimentos, os animais foram colocados em câmaras higienizadas para controle da microbiota desde o ED1; deste modo, a maturação do sistema imune e/ou o desenvolvimento deste, bem como a absorção intestinal de nutrientes, pode ter sido diferente daquele de animais criados em condições convencionais. Devemos salientar, no entanto, que as aves utilizadas não eram SPF e podem, desta forma, ter seus intestinos contaminados por outras cepas de *C. perfringens* localizados na superfície dos ovos.

Parece-nos que a presença do tioglicolato na alimentação dos frangos (T e T/HS35) esteja relacionada com o desenvolvimento de inflamação do intestino. Desta forma, esta substância irritante pode ser responsável pela migração de células polimorfonucleares e macrófagos para o intestino, onde podem ter libertado mediadores pró-inflamatórios, tais como as citocinas e enzimas, fato já relatado por Gautier et al. (2013) em outras condições experimentais.

A diferença observada na produção de muco entre os animais infectados e estressados (I/HS35) e os animais infectados e não estressados (I) pode ter sido um importante fator na modulação intestinal que propiciou a infecção pelo *C. perfringens*. Parece confiável dizer que o aumento do *turnover* das células epiteliais e o número das células de Goblet impediram a proliferação dos bacilos localizados próximos da mucosa, uma vez que eles foram incapazes de encontrar o substrato primário para sua adesão e proliferação. A esse respeito, um pequeno e significativo número de colônias de bactérias foi encontrado perto do epitélio dos animais infectados e estressados pelo calor (Figura 1).

Foi observada uma redução significativa no número de leucócitos polimorfonucleares, particularmente dos heterofilos, nas vilosidades intestinais e lâmina própria dos animais infectados e estressados (I/HS35) em comparação com os animais infectados não estressados (I).

Mostrou-se que o estresse térmico aumentou os níveis séricos de corticosterona (QUINTEIRO-FILHO et al., 2012a); a corticosterona é conhecida por seus efeitos imunomoduladores (SHINI; KAISER, 2008; SHINI et al., 2010). Assim, a redução do processo inflamatório desencadeado pelo tioglicolato pode ter sido decorrência da diminuição, induzida pela corticosterona, no número de heterofilos presentes nos intestinos dos animais estressados. A redução inflamatória também foi acompanhada por diminuição significativa do número de regiões necróticas, bem como pela fusão das vilosidades e congestão encontrados nas aves do grupo I (Tabela 3). Na verdade, o estresse por calor por meio da alteração do eixo HPA poderia ter modulado a resposta dos linfócitos intestinais, como relatado em outro local num contexto diferente (DOMINGUES-JUNIOR et al., 2000). Neste contexto, as diferenças significativas na distribuição dos heterofilos na mucosa intestinal pode ter sido mediada pela quantidade e qualidade das citocinas ou quimiocinas liberadas pelas células do sistema imune e pelo epitélio intestinal nas diferentes condições experimentais (HARMON, 1998; BOJESEN et al., 2004; ZEKARIAS et al., 2005).

Por conseguinte, observamos uma tendência para valores mais baixos de escores de lesão total nos animais estressados e infectados (I/HS35) em relação aos infectados do grupo não estressado (I). A análise microscópica dos resultados dos animais infectados (I e I/HS35) também reforça e concorda com os dados reportados quando da análise dos dados brutos. Notavelmente, observamos pontuações significativamente inferiores de necrose, congestionamento e fusão de vilosidades nos animais estressados (I/HS35) quando comparados aos não estressados (I), fato este acompanhado por um aumento da produção de muco neutro e ácido, conforme mostrado por meio das colorações histoquímicas. Os focos de colonização bacteriana nas vilosidades foram mais discretos nos animais estressados (I/HS35), sendo as reações inflamatórias observadas neste grupo caracterizadas, principalmente, por um pequeno número de heterofilos na mucosa intestinal (Figura 2 e Tabela 4). Este aumento do número de fusões de vilosidades observado na mucosa dos animais estressados (I/HS35) não foi observado no duodeno dos frangos não estressados (I),

que apresentaram predominantemente fusões de vilosidades caracterizadas como discretas a moderadas.

Nossos resultados mostraram que os frangos do grupo I/HS35 apresentaram infiltrado heterofílico moderado. Em contraste, foram encontrados heterofilos com distribuição difusa nos frangos de corte dos grupos I. Uma das principais conclusões do exame histopatológico dos intestinos dos frangos de corte estudados foi a existência de uma associação entre o menor número de heterofilos na mucosa intestinal e o menor número de escores de lesões (Tabela 4 e Figura 2). Assim, pode-se sugerir que a presença dos heterofilos esteja relacionada com a lesão tecidual e, em consequência, com maior redução do processo infeccioso.

A maioria dos achados histopatológicos encontrados nos animais não estressados (T e I) pode ser relacionadas aos efeitos do sistema imune intestinal. Mais especificamente parece-nos que, na tentativa de combater a infecção, o sistema imune tenha danificado os tecidos do frango em decorrência da liberação de radicais livres e enzimas que são conhecidos por contribuir para o desenvolvimento de processos infecciosos (DYLAG et al., 2013). Nossa hipótese é que as melhores condições clínicas encontradas nos animais estressados pelo calor (I/HS35) possa estar relacionada com a redução da inflamação intestinal induzida pelo estresse; especificamente, a redução induzida pelo estresse do infiltrado das células polimorfonucleares intestinais. De fato, esse fenômeno permitiria que os animais se recuperassem do processo infeccioso já que o sistema imune não induziria *per se* lesão no epitélio intestinal.

Com base nestes dados pode-se dizer que, o estresse por calor induzido experimentalmente parece ter impedido o desenvolvimento de enterite necrótica pelo *C. perfringens* tipo A; no entanto, é possível levantar a hipótese de que o estresse térmico tenha efeitos opostos em condições de campo, ou seja, nesta condição ele contribuiria para o surgimento de enterite necrótica aviária. É possível que por aumentar a liberação de corticosterona, o estresse por calor possa diminuir a resposta imune inata dos frangos na produção industrial comercial. Neste caso ela diminuiria a resistência dos animais a outros agentes patogênicos, tais como coccídias, que por sua vez predisporiam os animais à NE. Os dados fornecidos por estudos de outros estressores em outros hospedeiros sustentam esta hipótese (PALERMO NETO; MASSOCO; FAVARE, 2001; QUINTEIRO-FILHO; RIGHI; PALERMO-NETO, 2009; COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010). Ao todo, os

dados agora obtidos sugerem que a ativação do sistema nervoso central pelo estresse térmico seja responsável por alterações na imunidade intestinal reforçando este achado a ideia da existência de uma ligação entre os sistemas nervoso e imune na manutenção da homeostase intestinal.

5 EFEITOS DO ESTRESSE POR CALOR SOBRE A FORMAÇÃO DE CENTROS GERMINAIS ESPLÊNICOS E INTESTINAIS E A PRODUÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS EM FRANGOS DE CORTE INFECTADOS POR *Clostridium perfringens* TIPO A²

5.1 INTRODUÇÃO

O estresse por calor é um dos estressores ambientais mais comuns na avicultura industrial. Nas aves, esta condição aumenta os níveis de corticosterona e de catecolaminas no plasma e no soro pela activação do eixo HPA e do SNAS, respectivamente (HERMAN; CULLINAN, 1997; DEBUT et al., 2005; QUINTEIRO-FILHO et al., 2010). As ativações do eixo HPA e do SNAS, por sua vez, induzem modificações comportamentais e imunes que modulam a resposta dos hospedeiros, predispondo-os ao desenvolvimento de infecções (MINTON, 1994).

O baço é um órgão imune que apresenta vários compartimentos complexos, sendo responsável pela manutenção e produção de células do sistema imune do hospedeiro (JEURISSEN, 1993). No entanto, devido à complexidade do baço, são necessárias análises refinadas para determinar o tipo de mudanças que ocorrem em seus compartimentos, como nos centros germinais (CGs) (ROMPPANEN, 1981; ROMPPANEN; SORVARI, 1981; JEURISSEN, 1993). Os pesos relativos de órgãos linfóides têm sido relatados como metodologia rápida e fácil para identificar deficiências imunes em aves; no entanto, estes métodos não consideram a complexidade de tais órgãos, o que, na maior parte das vezes não caracteriza a imunomodulação real que neles está ocorrendo (MARSH; LAUTERIO; SCANES, 1984; WALKDEN-BROWN et al., 2013). De fato, alguns órgãos, como o baço são capazes de se contrair sendo, portanto, diretamente influenciado por alterações hemodinâmicas impostas pelo estresse por calor, o que pode influenciar seu peso relativo (ENGAN; SCHAGATAY, 2015). Para melhor compreender as alterações que ocorrem nos compartimentos do baço, tal como nos CGs, é necessário que se faça

² Traduzido e adaptado de: CALEFI, A. S.; DE SIQUEIRA, A.; NAMAZU, L. B.; COSTOLA-DE-SOUZA, C.; HONDA, B. B. T.; FERREIRA, A. J. P.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; DA SILVA FONSECA, J. G.; PALERMO-NETO, J. Effects of heat stress on the formation of splenic germinal centres and immunoglobulins in broilers infected by *Clostridium perfringens* type A. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 171, p. 38-46, 2016.

uma análise morfométrica associada a uma análise estereológica (GIL; WEIBEL, 1972).

Os anticorpos secretados e circulantes são capazes de debelar infecções; a produção e manutenção de imunoglobulinas ocorre nos compartimentos esplênicos, tais como os CGs esplênicos e nas mucosas (JEURISSEN, 1991). Os CGs são responsáveis pela manutenção dos linfócitos B de memória; além disso, nesta região, ocorre a troca de isotipo de anticorpos, um componente importante da manutenção da resposta humoral adaptativa (ARAKAWA et al., 1996).

Estudos anteriores demonstraram que o estresse por calor reduz os pesos relativos dos órgãos linfóides e modifica a produção de imunoglobulinas nas aves (FRANCI et al., 1996; QUINTEIRO-FILHO et al., 2010). Assim, alterações linfóides induzidas por condições estressoras pode predispor o animal a infecções entéricas, tais como *Salmonella* (QUINTEIRO-FILHO et al., 2010).

O objetivo deste estudo foi analisar em frangos de corte os efeitos do estresse por calor em associação a uma inflamação intestinal induzida por ingestão de meio de cultura contendo tioglicolato e/ou por uma doença entérica (infecção *Clostridium perfringens*) sobre os níveis de corticosterona plasmática, níveis séricos e intestinais de imunoglobulinas, morfometria dos CGs esplênicos, pesos relativos do baço e bursa de Fabricius e peso corporal.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Animais

Frangos de corte machos (Cobb 500[®]), provenientes de incubatório comercial, foram alojados em isoladores de um metro quadrado cada (Alesco, São Paulo, Brasil) a partir do primeiro dia de vida. Os animais foram mantidos em um ciclo de claro/escuro de 12/12 horas de luz, com as luzes acesas às 7:00 h. Os frangos receberam água *ad libitum* e manejo alimentar específico (descrito no protocolo de infecção). Os animais foram mantidos e utilizados de acordo com as orientações e aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina

Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil (n° 2570/2012).

5.2.2 Formação de grupos

No dia experimental 1 (ED1) e até o último dia experimental (ED19), um total de 36 frangos foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos diferentes de seis animais cada: grupo controle (C); animais alimentados com meio de cultura tioglicolato (T); grupo infectado por *C. perfringens* (I); grupo controle submetidos ao estresse por calor (C/HS35); animais alimentados com caldo tioglicolato e estressados por calor (T / HS35) e animais infectados por *C. perfringens* e estressados por calor (I/HS35).

5.2.3 Protocolo de estresse por calor

Animais dos grupos estressados pelo calor (C/HS35, T/ HS35 e I/HS35) foram mantidos em uma temperatura ambiente de $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ do ED14 ao ED19. Durante este período, as aves não estressadas por calor (N, T e I) foram criadas dentro das condições térmicas ambientais recomendadas para a linhagem.

5.2.4 Preparo do inoculo e protocolo de infecção

O presente protocolo foi estabelecido anteriormente por Calefi et al. (2014). Foi utilizada uma cepa patogênica de *C. perfringens* tipo A (cepa CP8.2, genótipo para produção das toxinas Tpel e α). Esta cepa bacteriana vem sendo mantida em nossos laboratórios em glicerol a -80°C . O inoculo foi preparado seguindo-se o procedimento descrito por Cooper e Songer (2010). Resumidamente, o inóculo foi preparado por meio de dois cultivos alternativos em meio caldo tioglicolato (Becton, Dickinson e Companhia, MD, EUA) com 2% de extrato de levedura (Becton, Dickinson e

Companhia) e meio de carne cozida (Becton, Dickinson e Companhia). As bactérias (1×10^8 ufc/mL) foram oferecidas para os frangos do ED15 ao ED19 em comedouros de alumínio, em uma concentração final de aproximadamente 1×10^4 ufc/mL.

Nos primeiros 7 dias de vida, os frangos de todos os grupos foram alimentados com uma ração para aves contendo 24% de proteína bruta (PB), sem antimicrobianos. Do ED8 a ED14, os animais receberam uma dieta rica em proteínas (28% PB) misturada com farinha de peixe (55% PB) em uma proporção de 1:1 (v/v). A partir do ED15 e até o ED21, o meio de cultura contendo a cepa patogênica de *C. perfringens* tipo A (grupos I e I/HS35; 1×10^8 ufc/mL) ou o meio de cultura caldo tioglicolato (grupos T e T/HS35) foram misturados na ração na proporção 1:1 (v/v), e fornecidos aos frangos. As concentrações finais de bactérias foram de cerca 1×10^4 ufc/g de ração. Embora diferente em consistência do usual, a ração, mais o MFT com ou sem bactérias foram normalmente ingeridas pelos animais; o consumo diário de ração misturado ao meio de cultura foi de aproximadamente 100 g por animal, um valor não estatisticamente diferente do consumo de ração dos animais dos grupos controle (grupos C e T). A infecção, portanto, foi feita pela ingestão voluntária de alimento contendo o meio de cultura com o *C. perfringens*.

5.2.5 Quantificação dos CGs intestinais

No ED19, realizou-se necropsia de todos os frangos de corte imediatamente após a eutanásia. Porções do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) foram separadas e seccionados para exame macroscópico de toda a mucosa. Foram colhidas para exame histopatológico secções com 2,5 cm de comprimento da flexura duodenal inferior, jejuno (a região intermediária entre a extremidade do duodeno e divertículo de Meckel) e íleo (a região média entre divertículo de Meckel e junção ileocecal). As mesmas regiões foram coletadas de todos os animais, independentemente da presença de alterações macroscópicas.

Os tecidos coletados foram fixados em formol a 10% durante 48 horas; subsequentemente, os materiais foram embebidos em parafina segundo procedimento padrão de nossos laboratórios para inclusão de tecidos. Cortes

transversais de 5 µm foram corados com HE; outro conjunto de seções foram destinados a procedimento de imunohistoquímica.

Para identificar ambos CGs maduros e imaturos nas seções, os tecidos foram processados por imunohistoquímica para indentificação de linfócitos B. Para tal, os cortes foram desparafinizados e reidratados em concentrações descendentes álcool etílico. A peroxidase endógena foi bloqueada por meio de uma solução de 3% de peróxido de hidrogénio durante 30 minutos. A recuperação antigénica foi feita num forno de microondas durante 10 minutos em tampão citrato (pH 6,0) e as reações inespecíficas foram subsequentemente bloqueadas com soro de albumina bovina diluída a 3% em PBS.

As secções foram incubadas com o anticorpo primário (camundongo anti-galinha Bu-1, clone AV20, SouthernBiotech, EUA) diluída 1:50 em PBS em câmara escura *overnight*. As secções foram então incubadas com a base de peroxidase ADVANCE (Dako, Agilent Technologies, DK). A imunomarcação foi revelada com uma solução de diaminobenzidina cromogénico durante 1 min. Com a finalidade de identificar a morfologia intestinal, empregou-se como contraste a hematoxilina.

Três a cinco seções duodenais, coradas por HE e imunomarcadas pelo Bu-1, foram avaliadas, sendo os centros germinativos quantificados por contagem visual em microscopia óptica, considerando-se toda a área da secção.

5.2.6 Identificação bacteriana

No ED19, o duodeno, jejuno e íleo das aves foram dissecados; o seu conteúdo foi pesado e diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,2, 0,01 M), sendo depois plaqueado em meio de infusão de cérebro e coração (BHI) contendo 0,5% de extrato de levedura e 5% de sangue bovino citratado. O conteúdo foi diluído e incubado em condições anaeróbias a 37°C durante 48 horas. Após a incubação, as colônias bacterianas foram avaliadas pelo tipo de hemólise que produziram no meio de cultura e pela morfologia da colônia. Testes respiratórios ou de coloração Gram foram realizados nas colônias isoladas para confirmar existência de similaridade com o *C. perfringens*.

5.2.7 Quantificação dos níveis de IgA intestinal

Foram excisadas seções de 4 cm do duodeno (antes da flexão duodenal) e jejuno (entre a parte final do duodeno e divertículo de Meckel). A lavagem intestinal foi realizada utilizando-se 5 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,2, 0,01 M) contendo inibidores de protease pepstatina (0,7 mg / ml) e leupeptina (0,5 mg/mL) a 4°C. Os conteúdos da lavagem foram recuperados e centrifugados a 10000 g durante 10 min a 4°C, e o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -20° C até a quantificação. As concentrações de imunoglobulinas secretórias (sIgA) foram determinadas empregando-se kits comerciais ELISA (Bethyl Laboratórios, Montgomery, EUA).

5.2.8 Quantificação de corticosterona no soro

No ED19, foram coletadas amostras de sangue da veia braquial dos animais de todos os grupos; os soros foram obtidos para a quantificação hormonal. Os níveis de corticosterona foram quantificados por kit de ELISA comercial (Ensaio Arbor, Michigan, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, precedidos por diluições padronizadas. A corticosterona no soro foi determinada com a ajuda de uma curva padrão expressa em picogramas por mililitro de corticosterona no soro (pg/mL); os resultados foram multiplicados pelo fator de diluição utilizado no teste.

5.2.9 Quantificação IgA, IgM e IgY no soro

A quantificação dos níveis de IgA, IgM e IgY no soro foi realizada no ED21 por meio de produtos comerciais ELISA (Bethyl Laboratories, Montgomery, EUA). As concentrações de imunoglobulina no soro foram determinadas com a ajuda de uma curva padrão, expressa em nanogramas por mililitro de soro (ng/ml), tal como

sugerido pelos fabricantes; os resultados foram multiplicados pelo fator de diluição utilizado no teste.

5.2.10 Determinação do peso corporal e peso relativo do baço e bursa de Fabrícus

Os pesos corporais dos animais foram determinados pela diferença da média dos pesos no ED1 e o peso individual no ED19. Para determinação dos pesos relativos do baço e bursa de Fabrícus, os órgãos foram pesados individualmente sendo analisada a relação [peso do órgão/peso corporal].

5.2.11 Preparações do baço e avaliações morfométricas

No ED19, os baços foram colhidos dos frangos e seccionados ao meio. Os tecidos foram submetidos a fixação em solução de formaldeído tamponada a 10% durante 48 horas. A inclusão seguiu o procedimento padrão de inclusão usado em nosso laboratório; secções de 6 µm foram retiradas a intervalos de 400 µm até um total de seis secções por baço. As secções foram, então, coradas com hematoxilina e eosina.

Os parâmetros examinados do baço foram avaliados por meio do método de contagem de pontos usando-se o programa ImageJ (ABRAMOFF et al., 2004) e seu pacote associado para determinação dos pontos (RØNN et al., 2000). As fotos foram tiradas com o auxílio de um estereoscópio (Olympus SZX7 e Câmara D71, Olympus, EUA) para determinação da área do perfil de baço (Asp). Um microscópio (Nikon Eclipse Ni-U e câmera Nikon DsRi1-U3, Nikon, EUA) para medir a área dos centros germinais (AGC; 30x de ampliação). Apenas os centros germinais com uma cápsula fibrosa foram considerados na avaliação. As equações de Romppanen (1981), apresentados na Tabela 1, foram usadas para a determinação morfométrica dos seguintes parâmetros: área de secção do baço (Asp), número de CGs por mm² de secção de baço (Nagc), área de CG nas secções de baço (Agc), densidade

volumétrica dos CGs no baço (V_{vgc}), densidade numérica dos CGs no baço (N_{vgc}), número total dos CG no baço (N_{gcsp}), diâmetro médio de CG (D), a distância mais próxima dos CGs (Δ_2) em um plano de corte e a distância mais próxima no espaço dos CGs (Δ_3).

Quadro 4 - Parâmetros estereológicos e morfométricos avaliados com as respectivas fórmulas

Parâmetro	Fórmula
Área da seção do baço (Asp)	$Asp = Psp \times l^2$
Número de perfís de centros germinais (GC) por 1 mm ² de seção de baço (Nagc)	$Nagc = (Ngc \times k) / Asp$
Área dos perfís de GC por secção do baço (Agc)	$Agc = Pgc \times l^2$
Densidade volumétrica dos GCs no baço (Vvgc)	$Vvgc = Agc / Asp$
Densidade numérica dos GCs no baço (Nvgc)	$Nvgc = (1/\beta) \times K \times (Nagc^3 / Vvgc)^{1/2}$
Número total de CGs no baço (Ngcsp)	$Ngcsp = (W/s) \times f^3 \times Nvgc$
Diâmetro médio dos GCs (D)	$D = 2 \times [(3/4\pi) \times (Vvgc/Nvgc)]^{1/3}$
Distância mais próxima entre os GCs no plano (Δ_2)	$\Delta_2 = 0.5 \times (1/Nagc)^{1/2}$
Distância mais próxima entre os GCs no espaço (Δ_3)	$\Delta_3 = 0.554 \times (1/Nagc)^{1/3}$

Fonte: (CALEFI et al., 2016)

Nota: **Psp** – número de pontos que caem dentro do baço; **l** – distância entre pontos; **Ngc** – número de CGs por secção de baço; **k**- fator de correção para o número de CGs não discerníveis devido a um corte tangencial. Estabelecido como 1.13 ± 0.2 utilizando 5 baços; **Pgc** – número de pontos que caem dentro do centro germinal; **W** – peso do baço; **S** – gravidade específica do baço segundo o princípio de Arquimedes; **f** – fator de encolhimento do tecido após processamento histotécnico.

5.2.12 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa R, versão 3.1.2 (Fundação R para Computação Estatística, Viena, Áustria). Os gráficos foram feitos utilizando-se o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA). Todos os dados foram analisados por Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn; uma análise da variância de três vias (ANOVA) foi utilizada para investigar a existência de interações entre os fatores (infecção por *C. perfringens*,

ingestão de tioglicolato e estresse térmico por calor), seguido pelo teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Confirmação da infecção

Colônias de *C. perfringens* foram recuperadas dos intestinos de todos os frangos infectados (grupos I e I/HS35).

5.3.4 Níveis séricos de corticosterona

Os níveis séricos de corticosterona estão apresentados na Figura 3. Tal como pode ser visto, o estresse térmico *per se* aumentou a concentração de corticosterona no soro nos animais do grupo controle estressados por calor (C/HS35) quando comparados com os do grupo de controle (C). Os animais dos grupos T e I apresentaram uma tendência a maiores concentrações de corticosterona sérica que os do grupo controle (C). Os frangos dos grupos T/HS35 e I/HS35 apresentaram níveis de corticosterona no soro semelhantes ao grupo controle C ($P > 0,05$). A ANOVA demonstrou a existência uma interação significativa entre a administração do caldo tioglicolato e o estresse térmico por calor no tocante aos níveis séricos de corticosterona ($P < 0,001$).

5.3.3 Níveis séricos de imunoglobulinas

Como se depreende da análise da Figura 4, o estresse por calor (grupo

C/HS35) não afetou as concentrações de IgA (Figura 4A), IgM (Figura 4B), ou IgY (Figura 4C). No entanto, a ingestão de tioglicolato diminuiu a concentração sérica de IgA em animais estressados e não estressados que receberam o mesmo (grupos T e T/HS35) em comparação com os animais infectados (grupo I) ($P < 0,05$) (Figura 4A). Os frangos do grupo I/HS35 apresentaram uma tendência para níveis mais baixos de IgA no soro em relação aos animais do grupo I.

Não foram encontradas diferenças nas concentrações de IgM entre os grupos experimentais (Figura 4B; Teste de Tukey). No entanto, a ANOVA de três vias indicou uma diferença significativa induzida pela infecção do *C. perfringens* nas concentrações séricas IgM dos frangos estressados por calor ($p = 0,022$).

Outras análises estatísticas mostraram que o meio de tioglicolato *per se* aumentou as concentrações séricas de IgY (grupo T) em comparação com os animais do grupo controle e controle estressado por calor (grupos C e C/HS35) ($p < 0,05$) (Figura 4C). Em contraste, as aves do grupo tioglicolato estressado (T/HS35) apresentaram concentrações séricas IgY menores que aquelas dos animais dos grupos controles (C e C/HS35). Não foram observadas diferenças entre as concentrações séricas IgY entre as aves dos grupos infectados, estressado ou não (I e I/HS35) (Figura 4C). A ANOVA revelou diferenças significantes nas concentrações séricas IgY nos grupos submetidos ao estresse térmico, infecção por *C. perfringens*, e ingestão do caldo tioglicolato; além disso, mostrou-se a existência de interações entre o estresse térmico por calor e a infecção por *C. perfringens* e entre o estresse térmico por calor e os efeitos da ingestão do caldo tioglicolato.

5.3.2 Níveis de imunoglobulina intestinal (sIgA)

Foi observada uma tendência para diminuição da concentração de IgA no duodeno dos animais do grupo C/HS35 em comparação com aquela medida nos animais do grupo C ($P > 0,05$) (Figura 5A). Foi observado também um aumento significativo na concentração sIgA em frangos dos grupos I e I/HS35 comparados aos frangos do grupo C/HS35 C; no entanto, não foram encontradas diferenças entre os dados destes dois grupos em relação aos dos animais do grupo C (Figura 5A). O grupo T/HS35 apresentou diminuição dos níveis de IgA duodeno, em comparação

com os frangos dos grupos T, I e I/HS35 (Figura 3A). A ANOVA mostrou a existência de diferenças significantes entre o estresse por calor, a infecção por *C. perfringens*, e a ingestão do caldo tioglicolato; uma análise mais aprofundada revelou a existência de uma interação entre o estresse térmico e a infecção por *C. perfringens* para os níveis de IgA na luz intestinal do duodeno.

Tal como mostrado na Figura 5B, os níveis de sIgA nas aves do grupo C/HS35 foram menores em comparação aos medidos nos animais do grupo Controle (grupo C; $P > 0,05$). Os animais do grupo T/HS35 apresentaram uma diminuição significativa na concentração de IgA no Jejuno em comparação com aquela medida nos frangos do grupo T. Uma análise mais profunda mostrou uma tendência para uma diminuição nas concentrações de sIgA no jejuno dos animais infectados e estressados por calor (I/HS35) em comparação com aquelas mensuradas em aves não estressadas (grupo I; Figura 3B).

Figura 3 - Quantificação dos níveis séricos de corticosterona

Fonte: (CALEFI et al., 2016)

Legenda: Letras diferentes sobre as barras representam diferenças estatisticamente significantes (Teste de Tukey para múltiplas comparações). Grupo Controle (C); Grupo alimentado com caldo tioglicolato (T); grupo infectado com *Clostridium* (I); /HS35 indica o grupo estressado por calor.

Figura 4 - Quantificação dos níveis séricos de IgA, IgM e IgY

Fonte: (CALEFI et al., 2016)

Legenda: Letras diferentes sobre as barras representam diferenças estatisticamente significantes (Teste de Tukey para múltiplas comparações). Grupo Controle (C); Grupo alimentado com caldo tioglicolato (T); grupo infectado com *Clostridium* (I); /HS35 indica o grupo estressado por calor.

Figura 5 - Concentração dos níveis de IgA secretória no duodeno e jejuno

Fonte: (CALEFI et al., 2016)

Legenda: Letras diferentes sobre as barras representam diferenças estatisticamente significantes (Teste de Tukey para múltiplas comparações). Grupo Controle (C); Grupo alimentado com caldo tioglicolato (T); grupo infectado com *Clostridium* (I); /HS35 indica o grupo estressado por calor.

5.3.5 Peso corporal e pesos relativos do baço e Bursa de Fabricius

Os dados encontram-se resumidos na Tabela 2. A ingestão do caldo tioglicolato, com ou sem estresse por calor, não alterou o peso corporal dos animais, em relação às aves grupo do grupo controle (C) (Tabela 2). No entanto, os frangos do grupo I/HS35 apresentaram uma redução significativa do peso corporal em comparação com os animais do grupo C ($P < 0,05$).

Outras análises mostraram que os frangos do grupo C/HS35 apresentaram uma redução de 30% no peso relativo da Bursa de Fabricius em comparação com os do grupo C ($P < 0,05$). Da mesma forma, os animais do grupo T/HS35 apresentaram uma diminuição significativa no peso relativo da Bursa de Fabricius em comparação com os animais do grupo T ($P < 0,05$). Embora não seja significativa, foi observada uma interessante e significativa tendência de diminuição do peso relativo da Bolsa de Fabricius em frangos do grupo I/HS35, em comparação com os do grupo I.

Diferenças significativas entre os pesos relativos do baço não foram observadas entre os animais dos diferentes grupos.

Tabela 2 - Peso corporal e peso relativo do baço e Bursa de Fabricius em frangos submetidos a diferentes tratamentos

Parâmetros	C	C/HS35	T	T/HS35	I	I/HS35
Peso corporal	630.40 ^a ± 71.75	544.70 ^{a,b} ± 77.70	583.40 ^{a,b} ± 50.09	568.70 ^{a,b} ± 55.94	526.90 ^{a,b} ± 66.00	525.80 ^b ± 62.29
Peso relativo						
Bursa de Fabricius (g/g) x 10⁻³	2.25 ^a ± 0.45	1.55 ^{a,b,c} ± 0.41	2.41 ^{b,d} ± 0.50	2.12 ^c ± 0.45	2.00 ^{a,b,c,d} ± 0.421	1,79 ^d ± 0.35
Baço (g/g) x 10⁻⁴	9.26 ^a ± 2.75	7.80 ^a ± 2.10	8.23 ^a ± 1.71	8.47 ^a ± 1.59	7.75 ^a ± 3.47	8.73 ^a ± 4.55

Fonte: (CALEFI et al., 2016)

Legenda: As diferentes letras sobre as barras indicam diferenças significantes com $P < 0.05$ (teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn para comparações múltiplas). Grupo Controle (C); Grupo alimentado com caldo tioglicolato (T); grupo infectado com *Clostridium* (I); /HS35 indica o grupo estressado por calor.

5.3.6 Avaliações morfométricas do baço

Os dados relativos às análises morfométricas do baço são apresentados na Figura 6. A avaliação dos CGs mostrou que a administração de tioglicolato afetou significativamente o N_{agc}, N_{gcsp}, N_{vgc}, V_{vgc}, a distância entre CGs no espaço ($\Delta 3$), e no plano ($\Delta 2$). A infecção por *C. perfringens* induziu mudanças na média da distribuição numérica e na densidade volumétrica de CGs e nas distâncias bi-dimensionais entre os CG (parâmetros N_{AGC}, N_{vgc} e $\Delta 2$) no baço dos frangos infectados em comparação com os animais não infectados ($P < 0,05$; grupo C). Outras análises mostraram que o estresse por calor associado com a ingestão do caldo tioglicolato e a infecção por *C. perfringens* induziram alterações significantes em todos os parâmetros morfométricos medidos, quando comparados com aquelas dos animais não estressados (grupos T e I; Figura 6). As mesmas mudanças também foram observadas para a interação infecção: estresse ($P < 0,05$) para todos os parâmetros morfométricos analisados; no entanto, a interação tioglicolato: stresse não induziu alterações na densidade volumétrica dos CGs no baço dos frangos (V_{vgc}; $P = 0,2883$). De modo geral, pode-se dizer que o estresse térmico diminuiu os parâmetros morfométricos em animais que receberam apenas meio de cultura tioglicolato (grupo T/HS35) quando comparado com animais não estressados (grupo T). Nos animais infectados, o efeito foi oposto. O estresse por calor aumentou os parâmetros morfométricos (grupo I/HS35) em comparação com os animais, não estressados e infectados (grupo I).

Figura 6 - Análise dos parâmetros histomorfométricos esplênicos

Fonte: (CALEFI et al., 2016)

Legenda: As diferentes letras sobre as barras indicam diferenças significantes com $P < 0.05$ (teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn para comparações múltiplas). Grupo Controle (C); Grupo alimentado com caldo tioglicolato (T); grupo infectado com *Clostridium* (I); /HS35 indica o grupo estressado por calor.

5.3.7 Quantificação dos CGs duodenais

Os dados relativos à quantificação dos CGs por HE e Bu-1 imunmarcados encontram-se resumidos na Figura. 7. A infecção por *C. perfringens* aumentou o número de CGs na lamina própria do duodeno em comparação com os animais do grupo controle (grupo C; Figura 7A). Os animais que receberam apenas meio de cultura caldo tioglicolato (grupo T) não apresentaram diferenças estatisticamente significantes no número de CGs em comparação com os animais do grupo controle (grupo C). O estresse térmico per se não induziu alterações na contagem de CG no duodeno das aves. No entanto, os animais infectados e estressados (Grupo I / HS35) apresentaram menor número dos CGs em comparação com os animais infectados (grupo I; $P < 0,05$; Figura 7B). Embora não seja estatisticamente significativa, o estresse induzido pelo calor caracterizou-se pelo aparecimento de uma tendência para maior número de CGs nos animais do grupo T/HS35, quando comparados aos do grupo T ($P > 0,05$; Figura 7).

Figura 7 - Quantificação de CGs em intestinos corados por HE e imunomarcados para Bu-1

Fonte: (CALEFI et al., 2016)

Legenda: As barras do gráfico representam as médias $\pm$ erros padrão. A - quantificação de CG em preparados histológicos corados com HE. B – quantificação de CGs preparados histológicos imunomarcados para Bu-1. As letras diferentes nas partes superiores das colunas indicam diferenças significativas, em $P < 0,05$ (teste de Kruskal-Wallis seguido por múltiplas comparações).

5.4 DISCUSSÃO

O baço exerce um dos principais controles da imunidade humoral e é um local importante para apresentação de antígenos, manutenção de linfócitos B de memória e conversão e hipermutação de genes de imunoglobulinas (JEURISSEN, 1993). A imunidade humoral em animais é um mecanismo de defesa relevante contra desafios antigênicos, sendo considerada uma das principais rotas exploradas para garantir uma vacinação eficaz contra patógenos (COOPER; SONGER, 2009). Estressores, como o estresse térmico por calor modulam as respostas imunes e comportamentais de animais; estressores ambientais, tais como temperaturas elevadas aumentam os níveis de corticosterona sérica (DEBUT et al., 2005; QUINTEIRO-FILHO et al., 2010). Mostramos neste estudo que os frangos estressados por calor (grupo C/HS35) apresentaram aumento dos níveis séricos de corticosterona em comparação com animais não estressados (grupo C). Além disso, mostramos que os animais que ingeriram o caldo tioglicolato (grupo T) ou foram infectados por *C. perfringens* (grupo I) apresentaram maiores níveis de corticosterona sérica em comparação com os animais do grupo controle (grupo C). Curiosamente, a infecção ou estresse por calor *per se* aumentaram significativamente os níveis séricos de corticosterona, enquanto que os animais estressados e infectados e que receberam o caldo tioglicolato apresentaram níveis de corticosterona semelhantes aos medidos em condições basais. Altos níveis de corticosterona desencadeiam ativação do eixo HPA, reduzindo a liberação de ACTH (YOUNG; AKANA; DALLMAN, 1990). A corticosterona pode atuar diretamente sobre a liberação de glicocorticóides pelas glândulas adrenais (YOUNG; AKANA; DALLMAN, 1990). Assim, a exposição a longo prazo das aves ao estresse por calor pode ter ativado o *feedback* negativo do eixo HPA, o que se refletiria na redução ou liberação de corticosterona (VANDENBORNE et al., 2005). Como consequência de possível elevação das concentrações de corticosterona o *feedback* negativo pode ter sido ativado reduzindo os níveis séricos de corticosterona em algum momento anterior ao dia de análise dos grupos T/HS35 e I/HS35. Uma alta concentração de corticosterona nestes grupos pode ter sido alcançada de modo semelhante ao observado nos animais dos grupos C/HS35, T e I; neste caso, o tioglicolato e a infecção por *C. perfringens* seriam capazes de agir como estressores.

No presente estudo, foram observadas algumas relações entre o estressor e os níveis plasmáticos de imunoglobulinas. As variações encontradas nos níveis séricos de Ig nos pareceram mais relacionadas com os tipos de desafios intestinais impostos aos animais. Com efeito, observamos uma redução nos níveis séricos de IgA nos animais que ingeriram o meio de cultura tioglicolato, um fato que foi independente do calor. Uma vez que o tioglicolato provoca inflamação intestinal, esta inflamação por ele induzida poderia estar relacionada com o aumento das concentrações de IgA encontradas no intestino e com a diminuição dos níveis de IgA no soro.

No presente trabalho, os níveis de IgY, tipicamente ligada à imunidade adaptativa, foram maiores nas aves que receberam o caldo tioglicolato. Mostramos que o estresse térmico por calor reduziu os níveis de IgY nos animais do grupo T/HS35 em comparação com os animais do grupo T. Esta redução poderia estar relacionada com a diminuição da inflamação intestinal encontrada em animais do grupo T/HS35, fato que já foi relatado em outros trabalhos para o estresse térmico (CALEFI et al., 2014). Esta diminuição da inflamação intestinal induzida pelo estresse provavelmente suprime os processos de apresentação de antígeno, diminuindo a produção de imunoglobulina. Este efeito estressor também foi evidente nas concentrações de imunoglobulinas intestinais. De fato, encontramos uma diminuição significativa na concentração de sIgA no jejuno de animais do grupo T/HS35, em comparação com o de aves não estressadas (grupo T). Da mesma forma, observamos uma tendência para redução das concentrações de IgA nos animais do grupo C/HS35 (no duodeno e jejuno) em aves do grupo I/HS35 (jejuno) em comparação com animais não estressados (grupos C e I). Estes efeitos do estresse térmico sobre as concentrações de imunoglobulina secretadas podem estar relacionados com modificações relacionadas a ativações neuroendócrinas produzidas pelo estresse por calor e decorrentes, por exemplo, do aumento dos níveis de corticosterona, na Bursa de Fabricius, baço e/ou tecido linfóide associado intestinal (GALT) (ZAHRAA; GHAMDI, 2008). O estresse térmico diminuiu o peso relativo da Bursa de Fabricius nos animais do grupo T/HS35 em comparação com o observado nas aves do grupo T. Da mesma forma, observamos uma tendência para redução do peso médio relativo da Bursa de Fabricius nos animais dos grupos C/HS35 e I/HS35 em comparação com aqueles dos grupos C e I, respectivamente. Star et al. (2007) demonstraram que o estresse por calor (32°C por 23 dias) aplicado a linhagens puras de poedeiras produz uma imunoestimulação, mais precisamente, da resposta

imune específica. Este resultado que contrasta com os do presente estudo, que aponta ser o estresse supressor da resposta imune direcionada à produção de anticorpos. Em outro contexto, Honda et al. (2015) encontraram uma redução de linfócitos Bu-1⁺ na circulação após aplicação de um estresse por calor e vacinação por Newcastle. De fato, a maioria dos estudos em mamíferos e aves relatam ser o estresse crônico um imunossupressor (DHABHAR, 2014); no entanto, efeitos opostos também são encontrados na literatura em função de inúmeras variáveis como: intensidade, duração e tipo do estressor, momento de sua aplicação em relação à colheita dos dados, etc (DHABHAR, 2014).

Os dados aqui apresentados mostram que as alterações da morfologia dos CG do baço foram pronunciadas nos animais que receberam o caldo tioglicolato. A média de N_{agc} do grupo T foi 59% maior do que aquela medida no grupo C. O meio de cultura induziu, ainda, uma proliferação dos centros germinais, um fato que poderia estar relacionado com a proliferação de linfócitos B para produção das células de memória e plasmócitos, que produzem as imunoglobulinas durante a inflamação intestinal induzida pelo tioglicolato. Esse achado é relevante ao considerar o uso do caldo tioglicolato como modelo para indução de enterite necrótica em aves (MCREYNOLDS et al., 2004); de fato, a ingestão de caldo tioglicolato é um dos atuais modelos propostos para induzir infecção por *C. perfringens* na ausência de co-infecções (COOPER; SONGER, 2010). Embora nossos dados apoiem o uso desse modelo experimental, fica patente a necessidade de um experimento bem projetado, isto é, com o uso de grupos controle adequados (principalmente um grupo controle tioglicolato). Com efeito, de acordo com o presente conjunto de dados, o tioglicolato sozinho causou um efeito estatisticamente significativo no número total de CG (N_{gcsp}), na densidade de volume dos CG s (V_{vgc}), e na distância entre CG s no espaço 3-D no baços dos frangos ($\Delta 3$). Os valores elevados que foram encontrados para a distribuição de CG s em animais do grupo T, em comparação com os mensurados nos grupos controle (grupos C e C/HS35) foram menores em aves estressadas por calor (T/HS35).

Quando a infecção foi associada com o estresse por calor, os efeitos sobre N_{agc}, V_{vgc}, N_{vgc} e N_{gcsp} foram opostos aos observados nos frangos dos grupos T e T/HS35, ou seja, o estresse por calor aumentou a distribuição de CGs nos baços dos animais do grupo I/HS35 em comparação com os do grupo I (N_{agc}). A ANOVA mostrou que o estresse por calor e a infecção por *C. perfringens* apresentaram uma

interação estatisticamente significativa com relação aos efeitos induzidos sobre a diminuição de todos os parâmetros morfométricos quando comparados aos dos animais que foram infectados e não estressados.

A infecção aumentou o número dos CGs da lâmina própria duodenal (Figura 5). Embora não seja estatisticamente significativa, a ingestão do caldo tioglicolato aumentou a formação de CG no intestino, fato que se tornou mais nítido quando da aplicação do estresse por calor (Figura 5). Um efeito oposto foi encontrado nos animais infectados (Grupo I); eles apresentaram um aumento do número de CGs duodenais em comparação com os animais do grupo estressado (I/HS35; A Figura 5). Estes dados contrastam com a grande quantidade de sIgA no lavado duodenal das aves infectadas e estressadas por calor (I/HS35; Fig. 3A). Quer nos parecer que eles indicam, também que a secreção biliar fornece parte da sIgA quantificada no duodeno (ROSE et al., 1981).

Em resumo, tanto a infecção por *C. perfringens* como a ingestão de caldo tioglicolato induziram variações no número total de CG nos baços dos frangos; curiosamente, observamos que o estresse por calor aumentou estes parâmetros (Grupo I/HS35) e, ao mesmo tempo, reduziu os parâmetros morfométricos analisados em frangos do grupo T/HS35 em comparação com os animais dos grupos I e T. O oposto foi encontrado quando quantificados os GCs no duodeno, que foi reduzido em animais infectados e estressados por calor (I/HS35) e aumentado no grupo T/HS35. No entanto, em ambos os tratamentos, observou-se uma diminuição do número de CG s no intestino, fato que foi acompanhado por aumento de CGs no baço.

Em conjunto, esses resultados mostram que os desafios intestinais infecciosos e/ou químicos induzem mudanças nos CGs do baço. No presente caso, os desafios intestinais aumentaram o número de CGs provavelmente por meio da proliferação de linfócitos B. No entanto, o estresse térmico induziu diferentes graus de proliferação dos CG s em animais que ingeriram *C. perfringens* e caldo tioglicolato. O estresse por calor reduziu a inflamação do intestino e os danos nos animais infectados (Grupo I/CH35), contribuindo para a redução da proliferação de bactérias intestinais (CALEFI et al., 2014), para a redução da distribuição CG no duodeno e para a promoção do aumento da distribuição CGs no baço. Estes resultados indicam que a redução da lesão intestinal encontrada por Calefi et al. (2014) em animais infectados e estressados não está relacionado com um aumento da resposta humoral intestinal. Com efeito, a corticosterona em diferentes concentrações é capaz de ativar

ou suprimir a resposta linfocitária, embora o grau de supressão possa variar em função das diferentes populações de linfócitos (TROUT; MASHALY, 1995). Portanto, possíveis perfis de citocinas encontradas no intestino e no baço, e diferenças nas concentrações de neuropeptídeos libertados durante o estresse podem desempenhar um papel fundamental na formação dos CGs.

Biologicamente, os CGs estão relacionados com a resposta imune humoral do animal, por meio da manutenção de linfócitos B e da troca da classe de anticorpos (LIU; ARPIN, 1997). Deste modo, as reduções significantes e as tendências observadas neste estudo para a redução encontrada na produção de sIgA podem estar relacionadas tanto com as distribuições dos números de CG esplênicos como com a variação de CG no intestino (MACLENNAN, 2003; SCHWICKERT et al., 2007). Do mesmo modo, as alterações nas concentrações de corticosterona e de imunoglobulinas no sangue podem também estar relacionadas com as variações de CG (TROUT; MASHALY, 1994). No entanto, é possível que outras interpretações existam para as mudanças observadas na dinâmica de imunoglobulina dos frangos estressados pelo calor e infectados neste trabalho.

Tomados em seu conjunto, as presentes análises morfométricas de baços dos frangos revelaram mudanças sutis, e interessantes induzidas pelo estresse térmico de longo prazo (7 dias contínuos), especialmente nos níveis séricos de corticosterona e na formação de CG. Estas mudanças são relevantes, porque apontam para a existência de eventuais falhas nos protocolos de vacinação e no curso de doenças infecciosas intestinais em frangos de corte durante os períodos de estresse por calor.

6 EFEITOS DO ESTRESSE POR CALOR SOBRE A PRODUÇÃO DE CORTICOSTERONA, HISTOPATOLOGIA INTESTINAL E EXPRESSÃO DE C-FOS NO CÉREBRO DE FRANGOS DE CORTE INFECTADOS POR *Clostridium perfringens* TIPO A³

6.1 INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal (GI) apresenta a maior superfície do corpo de um animal voltada para o ambiente externo; ele tem sido considerado, assim, como um órgão sensorial (FURNESS; KUNZE; CLERC, 1999). De acordo com este ponto de vista, o trato GI monitora o que acontece no lúmen intestinal e lida com duas tarefas importantes ao mesmo tempo: a primeira, é processar o conteúdo luminal e cuidar da digestão e da absorção de nutrientes; a segunda, diz respeito à percepção da natureza dos materiais presentes no lúmen e a elaboração das respostas subsequentes a elementos potencialmente prejudiciais ao organismo como toxinas, antígenos e patógenos. Está cada vez mais evidente que estas tarefas aparentemente contraditórias são conseguidas por meio da interação de pelo menos três componentes encontrados no trato GI: uma rede neural de grande envergadura, uma grande coleção de células imunes, e várias células especializadas (FURNESS; KUNZE; CLERC, 1999; HOLZER, 2002; SHARKEY; MAWE, 2002). Diversos estudos têm apontado para o fato de que, além de controlar a motilidade e as respostas secretoras subsequentes à ingestão de alimentos, as interações entre os sistemas nervoso e imune dentro do intestino são importantes contribuintes para os padrões anormais de movimentação intestinal observados em animais doentes (HÖLZER et al., 1994; FURNESS; KUNZE; CLERC, 1999; HOLZER, 2002). De fato, mostrou-se que mediadores (citocinas, serotonina, prostaglandina E2) liberados pelas células imunes durante a inflamação intestinal promovem a sensibilização de neurónios aferentes modificando o peristaltismo e levando a informação sensorial visceral para o sistema nervoso central (SNC) que a processa e a ela responde (GRUNDY, 2002;

³ Traduzido e adaptado de: CALEFI, A. S.; FONSECA, J. G. S.; COHN, D. W. H.; HONDA, B. T. B.; COSTOLA-DE-SOUZA, C.; TSUGIYAMA, L. E.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; FERREIRA, A. J. P.; PALERMO-NETO, J. Gut-brain axis interactions during heat stress and avian necrotic enteritis. **Poultry Science**, p. pew021, 2016.

HOLZER, 2002).

Infecções bacterianas entéricas, tais como aquelas observadas na enterite necrótica aviária são responsáveis por grandes problemas na indústria avícola (VAN IMMERSEEL et al., 2004). Causada por *Clostridium perfringens*, a enterite necrótica aviária é uma doença toxigénica desencadeada por bactérias Gram-positivas. As lesões observadas durante o curso desta doença são caracterizados pela presença de necrose associada a processos inflamatórios do intestino delgado (PARISH, 1961; CALEFI et al, 2014).

Gaykema et al. (2004) mostraram ocorrência de aumento da expressão de c-fos em neurônios cerebrais após uma infecção intestinal experimental como por bactérias patogênicas em camundongos. A imunomarcção do c-fos tem sido considerada uma medida segura do aumento da actividade neuronal durante ambos os processos inflamatórios (incluindo infecção aguda) e ocorrência de estresse (BASSO et al., 2003; COSTA-PINTO et al., 2005). O estresse é conhecido por acarretar perdas de produção, por reduzir o bem-estar animal (MITCHELL; KETTLEWELL, 1998) e por aumentar a susceptibilidade dos animais às doenças (QUINTEIRO-FILHO et al., 2012a,b). Num estudo recente, mostramos que o estresse térmico por calor auterou as lesões induzidas por *C. perfringens* em frangos, sugerindo este fato uma interação intestino-cérebro (CALEFI et al., 2014). Uma vez que a compreensão dos mecanismos desencadeados por infecções entéricas e pelo estresse podem ser relevantes para o manejo de doenças, pareceu-nos apropriado estudar as relações entre o estresse por calor, a infecção por *C. perfringens*, e a actividade do SNC em aves. Desta forma, analisamos o comportamento, a morfologia intestinal, a expressão de c-fos em núcleos cerebrais e os níveis séricos de corticosterona em aves estressadas e infectados ou não com *C. perfringens*.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Animais

Frangos de corte machos (n = 25, Cobb 500[®]), provenientes de incubatório

comercial, foram alojados em isoladores de um metro quadrado cada (Alesco, São Paulo, Brasil) a partir do primeiro dia de vida. Os animais foram mantidos em um ciclo de claro/escuro de 12/12 horas de luz, com as luzes acesas às 7:00 h. Os frangos receberam água *ad libitum* e manejo alimentar específico (item 5.2.3). Os animais foram mantidos e utilizados de acordo com as orientações e aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil (nº 2570/2012).

6.2.2 Grupos experimentais e estresse por calor

A partir do dia experimental 1 (ED1) ao ED13, as aves foram mantidas à temperatura ambiente recomendada ($33 \pm 1^\circ\text{C}$ do ED1 ao ED7, $28 \pm 1^\circ\text{C}$ do ED7 ao ED13). No ED1, os frangos foram alocados ao acaso em cinco grupos de cinco animais cada, sendo eles: grupo controle “naive” (N); grupo de animais que receberam caldo tioglicolato na alimentação (T); grupo de animais infectados com *C. perfringens* (I); animais que receberam o caldo tioglicolato e foram estressados por calor (T/HS35); e grupo de animais infectados por *C. perfringens* e estressados pelo calor (I/HS35). Do ED14 ao ED19, dos animais nos grupos não estressados pelo calor (N, T e I) foram mantidos a uma temperatura ambiente de $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Os frangos dos grupos estressados por calor (T/HS35 e I/HS35) foram mantidos à temperatura ambiente de $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ do ED14 até o ED19.

Fez-se uma análise comportamental nos animais de todos os grupos nos ED17, ED18 e ED19. Imediatamente após a última análise comportamental (ED19), os animais foram eutanasiados, sendo utilizados para colheita de tecidos para análise da expressão de c-fos em diferentes núcleos do SNC, para a determinação dos níveis de corticosterona sérica e para avaliação histopatológica intestinal. Os métodos utilizados para estas avaliações estão descritos abaixo.

6.2.3 Manejo alimentar

6.2.3.1 Manejo alimentar dos animais do grupo N

Nos 7 primeiros dias os animais foram alimentados com ração comercial para aves de produção contendo 24% de proteína bruta (PB). Do 8º ao 19º dia de vida os animais foram alimentados com ração contendo alta concentração proteica (28% PB).

6.2.3.2 Manejo alimentar dos animais dos demais grupos

Nos 7 primeiros dias de vida os animais foram alimentados com ração comercial para aves de produção contendo 24% de proteína bruta (PB). Do 8º ao 14º dia de vida os animais foram alimentados com ração de alta concentração proteica (28% PB) misturada na proporção de 1:1 (v/v) com farinha de peixe (55% PB). No 15º dia de vida iniciou-se o fornecimento do meio de cultura com cepa patogênica de *C. perfringens* (grupos I e I/HS35) ou meio de cultura tioglicolato (T/THS35) na proporção de 1:1 (v/v) com ração comercial para engorda com 28% de PB; o período de infecção perdurou até o dia 19 de vida, quando foi realizada a eutanásia dos animais.

6.2.4 Preparo do inoculo e protocolo de infecção

O presente protocolo experimental foi estabelecido anteriormente por Calefi et al. (2014). Uma cepa patogênica de *C. perfringens* tipo A foi utilizada (cepa CP8.2, genótipo para produção das toxinas Tpel e α). Esta cepa bacteriana tem sido mantida em nossos laboratórios em glicerol a -80°C. O inoculo foi preparado seguindo-se o procedimento descrito por Cooper e Songer (2010). Resumidamente, ele foi preparado por meio de dois cultivos alternativos: em meio caldo tioglicolato (Becton, Dickinson and Company, MD, EUA) com 2% de extrato de levedura (Becton,

Dickinson and Company) e em meio de carne cozida (Becton, Dickinson and Company). As bactérias (1×10^8 ufc/mL) foram oferecidas do ED15 ao ED19 para os frangos em comedouros de alumínio, com concentração final de aproximadamente 1×10^4 ufc/mL. A partir do ED15 ao ED19, o meio de cultura contendo a cepa patogênica de *C. perfringens* tipo A (grupos I e I/HS35; 1×10^8 ufc/mL) ou o meio de cultura caldo tioglicolato (grupos T e T/HS35) foram misturados na ração na proporção 1:1 (v/v), e fornecida aos frangos. As concentrações finais de bactérias foram de cerca 1×10^4 ufc/g de ração. Embora diferente em consistência do usual, a ração, contendo o com ou sem bactérias foi normalmente ingerida pelos animais; o consumo diário de ração misturado ao meio de cultura foi de aproximadamente 100 g por animal, um valor não estatisticamente diferente do consumo de ração dos animais dos grupos controle (grupos N e T). A infecção ocorreu pela ingestão voluntária de alimento contendo o meio de cultura com o *C. perfringens*.

6.2.5 Avaliação comportamental

Frangos de todos os grupos foram avaliados para diversos parâmetros comportamentais por 5 minutos nos ED17, ED18 e ED19; uma câmera digital (Sony, DSC W330, Sony, EUA) foi usado para registrar o comportamento dos animais dentro de seus locais de criação. Os vídeos foram posteriormente avaliados quanto à frequência dos seguintes parâmetros comportamentais: permanência em pé, alimentando-se, andando, sentado, comportamento tipo sonolento, auto-limpeza, bebendo água e presença de respiração ofegante.

6.2.6 Preparo do tecido cerebral e imunohistoquímica para c-fos

No ED19, os frangos foram anestesiados com uma combinação de xilazina (0,1 mg/kg) e cetamina (0,5 mg/kg), injetada via intracelomática. Uma vez que o plano anestésico foi atingido, uma incisão paralela ao esterno foi feita para acessar o coração do animal. Uma cânula acoplada a uma bomba peristáltica foi então inserida

no ventrículo esquerdo para a injeção de uma solução salina a 0,9% aquecida a 38° C. Foi feita uma incisão no átrio direito no início da infusão para ejeter o sangue do animal. A perfusão de solução salina durou 10 min, em sequência, os animais foram perfundidos com formaldeído a 4% durante 15 min. Os cérebros fixados foram removidos dos crânios e armazenado durante 48 horas numa solução de sacarose a 30%. Subsequentemente, secções coronais congeladas de 30 µm de espessura foram recolhidos de cada cérebro de frango e colocadas em tubos com 0,1 M de solução salina de tampão fosfato (PBS), pH 7,4. Um em cada doze conjuntos de secções foram, então, disponibilizadas para realização da imunohistoquímica. Cada conjunto de secções do cérebro foi armazenado numa solução de 30% de etileno glicol a -20 °C até o procedimento de imunomarcação de c-fos.

Um conjunto de secções de cérebro de cada animal foi lavado em PBS três vezes durante 10 minutos cada. As secções foram então tratadas com uma solução de peróxido de hidrogénio a 5% em PBS durante 30 minutos para degradar as peroxidases endógenas. Após lavagem em PBS, os tecidos foram incubados durante 18 h a 4°C com uma solução contendo o anticorpo policlonal de coelho anti-c-fos primário (Ac-5, Calbiochem, San Diego, CA, 1: 1000), 5% de soro de cabra e 0,5% de Triton X-100. As secções foram lavadas em PBS e incubadas durante 1 h com o polímero de detecção (SuperPicture, Invitrogen Canada Inc. Burlington, CA). Após lavagem em PBS, as secções foram embebidas numa solução de diaminobenzidina cromogênico durante 10 min. As secções foram montadas em lâminas de vidro para avaliação por microscopia óptica.

Um conjunto de secções de cada animal foi utilizado para a visualização de células c-fos imunorreativas na área pré-óptica medial (POM), núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), amígdala (Amy), e *globus pallidus* (GP).

6.2.7 Avaliações macroscópicas e histopatológicas

No ED19, a necropsia foi realizada em todos os frangos após o procedimento de perfusão. Todas as porções do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) foram avaliadas para alterações macroscópicas indicativos de enterite necrótica aviária.

Secções do duodeno, jejuno e íleo dos frangos foram fixadas em 4% de

formaldeído durante 24 horas; subsequentemente, o material foi embebido em parafina, seguido por um procedimento padrão usado em nossos laboratórios para a inclusão de tecido. Secções (5 µm) foram coradas separadamente com HE e Gram. O exame histopatológico foi realizado usando microscopia óptica.

Escore foram dados para os seguintes parâmetros considerados como indicativos de inflamação no duodeno, jejuno e íleo de todos os animais: a presença de células polimorfonucleares (heterófilos), células mononucleares e necrose. Foram atribuídos escores para cada um destes parâmetros inflamatórios como se segue: (1) leves, (2) moderados e (3) graves. As pontuações tomadas a partir das porções intestinais de cada ave foram somadas compondo-se uma pontuação total por ave. Isto é, a soma dos escores atribuídos aos infiltrados inflamatórios mononuclear e polimorfonuclear observados em cada porção intestinal.

6.2.8 Identificação bacteriana

O conteúdo do duodeno, jejuno e íleo foram diluídas em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,2, 0,01 M) e plaqueadas em meio de infusão de cérebro e coração (BHI) contendo 0,5% de extrato de levedura e 5% de sangue bovino citratado. Os conteúdos foram diluídos e incubadas sob condições anaeróbias a 37° C durante 48 horas. Após a incubação, as colônias de bactérias foram avaliadas com base no tipo de hemólise no meio de cultura e morfologia. Foram realizados testes de respiração e coloração de Gram nas colônias que foram isoladas.

6.2.9 Quantificação de corticosterona no soro

Os níveis séricos de corticosterona de cada ave foram quantificados utilizando-se kits ELISA comerciais (Ensaio Arbor, Michigan, EUA), precedido por uma diluição do soro normalizado. A corticosterona no soro foi determinada com a ajuda de uma curva padrão e foi expressa em nanogramas por mililitro de corticosterona de soro (ng/mL); os resultados foram multiplicados pelo fator de

diluição utilizado no ensaio para a interpretação.

6.2.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados não-paramétricos obtidos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Os dados paramétricos foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. As análises foram consideradas significantes quando $P \leq 0,05$.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Avaliações comportamentais

Conforme apresentado na Tabela 3, diferenças interessantes foram encontradas entre os padrões comportamentais analisados nos frangos estressados que foram ou não infectados com *C. perfringens*. No entanto, como se se depreende da tabela, observaram-se apenas tendências para mudanças nos parâmetros comportamentais analisados; estas tendências, no entanto, são relevantes e são indicativas de alguns efeitos das variáveis estudadas. Na verdade, tivéssemos empregado maior número de aves por grupo experimental, as diferenças observadas poderiam ter sido significantes. Assim, a infecção por *C. perfringens* diminuiu a frequência de alimentação, de permanência dos animais em pé, o arrancar de penas e, ao mesmo tempo, aumentou a frequência de comportamento do tipo sonolento (I-grupo). Alterações similares foram observadas nos animais que não foram estressados e que receberam o caldo tioglicolato na ração (grupo T). A Tabela 3 mostra, também, que o estresse térmico por calor amenizou alguns dos efeitos produzidos pelo *C. perfringens*, tais como permanência dos animais em pé ou se

movimentando (andar) e comportamento do tipo “dormindo”, mas não alterou os efeitos do patógeno sobre o arranque de penas (I/HS35).

6.3.2 Análises macroscópicas e histopatológicas intestinais

Os resultados macroscópicos intestinais das aves tratadas com *C. perfringens* (I-grupo) foram compatíveis com aqueles normalmente associados com casos de enterite necrótica aviária. Assim, o exame dos intestinos dos frangos mostrou uma distribuição multifocal de placas brancas e enegrecidas com fibrina na mucosa. Os tecidos estavam friáveis, o que significa que a serosa era facilmente retirada quando tocada. Estrias avermelhadas com conteúdo semelhante a fibrina também foram observados no lúmen intestinal. Alguns sinais indicativos de irritação ou inflamação intestinal foram encontrados nos intestinos dos frangos no grupo tioglicolato (grupo T). Alterações intestinais macroscópicas não foram observadas nas aves do grupo controle (grupo N).

6.3.3 Avaliação histopatológica intestinal

Como apresentado na Figura 8, a infecção por *C. perfringens* (grupo I) aumentou significativamente os escores de necrose, bem como os de inflamação (heterófilos e infiltrado linfoplasmocítico) em relação aos animais não estressados (grupo I/HS35). No entanto, os animais estressados pelo calor e infectados (I/HS35) não apresentaram diferenças em seus escores de necrose em comparação com o mensurado nas aves dos grupos N, T e T/HS35. Algum grau de inflamação e necrose e algumas células mononucleares foram também encontrados nas aves dos grupos de tioglicolato (T e T/HS35), mas diferenças significativas não foram evidenciadas nos animais do grupo controle não manipulado (N). Assim, parece viável afirmar que o estresse térmico por calor tenha melhorado ($P < 0,05$) a necrose intestinal nos animais infectados em comparação com os frangos infectados e não estressados (grupo I).

Figura 8 - Escores histopatológicos para inflamação e necrose intestinal

Fonte: (CALEFI et al., 2016)

Legenda: As diferentes letras sobre as barras indicam diferenças significantes com $P < 0.05$ (ANOVA e Tukey para comparações múltiplas). Grupo Controle (Naive); Grupo alimentado com caldo tioglicolato (T); grupo infectado com *Clostridium* (I); /HS35 indica o grupo estressado por calor.

Tabela 3 - Alterações comportamentais induzidas pelo estresse por calor e/ou infecção por *C. perfringens*

Comportamento	Grupos					P value*		
	N	T	T/HS35	I	I/HS35	Estresse	Infecção	Estresse: Infecção
<i>Em pé</i>	18 ^a	12 ^a	16 ^a	11 ^a	16 ^a	0,391	0.407	0.473
<i>Alimentando</i>	18 ^a	8 ^a	10 ^a	13 ^a	9 ^a	0,155	0.863	0.842
<i>Andando</i>	14 ^a	8 ^a	12 ^a	6 ^a	12 ^a	0,263	0.239	0.307
<i>Sentado</i>	26 ^a	27 ^a	31 ^a	22 ^a	27 ^a	0,098	0.080	0.919
<i>Semelhante dormindo</i>	4 ^a	6 ^a	1 ^a	7 ^a	4 ^a	0,074	0.176	0.782
<i>Auto-limpeza</i>	10 ^a	2 ^b	0 ^b	5 ^b	3 ^b	0,014	0.675	0.247
<i>Bebendo</i>	4 ^a	3 ^a	4 ^a	1 ^a	3 ^a	0,608	0.260	0.652
<i>Ofegante</i>	0 ^a	2 ^a	19 ^b	0 ^a	20 ^b	<2e-16	0.931	0.551

Fonte: (CALEFI et al., 2016)

Nota: *Letras diferentes sobre os números indicam diferenças significantes. ANOVA de duas vias e teste de Tukey-Kramer. As frequências são as observações de 5 animais por grupo.

6.3.4 Expressão de c-fos no SNC

O estresse térmico aumentou o número neurônios c-fos imunoreativos no PVN ($P < 0,05$) dos frangos, independentemente de terem eles sido infectados com *C. perfringens* (grupos I/HS35 e T/HS35). No entanto, os efeitos do estresse foram maiores nos animais infectados e estressados (I/HS35); de fato, os animais deste grupo exibiram maior número de neurônios c-fos reativos no núcleo paraventricular (Figura 9A). Um aumento na marcação de c-fos também foi observado nas aves nos grupos T e I em relação às do grupo controle (Grupo N). O estresse por calor diminuiu a ativação dos neurônios no GP dos animais infectados (Figura 9B). Os animais infectados (I e I/HS35) exibiram um aumento do número de neurônios c-fos reativos no POM em comparação com o observado nos animais do grupo controle (Grupo N; $P < 0,05$), no entanto uma diferença significativa não foi encontrada no POM entre os animais infectados e não-infectados e infectados e estressados (grupos I e I/HS35; Figura 9C). Nos animais que receberam apenas o caldo tioglicolato (grupo T) observou-se ativação neuronal semelhante àquela observada nos animais infectados ($P > 0,05$). Finalmente, uma pequena e não significativa redução do número de neurônios ativados foi induzida pelo estresse térmico por calor em animais do grupo que recebeu o caldo tioglicolato e que foram estressados (T/HS35) em relação aos animais não estressados (grupo T).

Tal como ilustrado na figura 3D, em contraste com as observações feitas no PVN, o estresse térmico diminuiu a marcação de c-fos na Amy em aves tratadas com tioglicolato (T/HS35), bem como naquelas infectados com *C. perfringens* (I/HS35); este efeito foi um pouco maior nos animais infectados. No entanto, não foram encontradas diferenças na marcação c-fos na Amy colhida dos frangos dos grupos N, T e I.

Figura 9 - Avaliação dos neurônios imunorreativos para c-fos em diferentes núcleos cerebrais

Fonte: (CALEFI et al., 2016)

Legenda: As diferentes letras sobre as barras indicam diferenças significantes com $P < 0.05$ (ANOVA e Tukey para comparações múltiplas). Grupo Controle (Naive); Grupo alimentado com caldo tioglicolato (T); grupo infectado com *Clostridium* (I); /HS35 indica o grupo estressado por calor.

6.3.5 Quantificação da corticosterona circulante

A Figura 10 mostra os níveis séricos de corticosterona. Foram encontradas diferenças significantes entre os diferentes grupos ($P < 0,001$). Os níveis séricos de corticosterona foram maiores nos animais dos grupos T e I, isto é, os animais infectados que ingeriram MFT apresentaram aumento nos níveis circulantes de corticosterona em comparação aos animais dos grupos N T/HS35 e I/HS35. Curiosamente, não foram encontradas diferenças significantes nos níveis séricos de corticosterona entre as aves dos grupos N, T/HS35 e I/HS35.

Figura 10 - Níveis séricos de corticosterona

Fonte: (CALEFI et al., 2016)

Legenda: As diferentes letras sobre as barras indicam diferenças significantes com $P < 0.05$ (ANOVA e Tukey para comparações múltiplas). Grupo Controle (Naive); Grupo alimentado com caldo tioglicolato (T); grupo infectado com *Clostridium* (I); /HS35 indica o grupo estressado por calor.

6.3.5 Identificação bacteriana

Colônias consistentes com *C. perfringens* foram isoladas a partir do conteúdo do duodeno, jejuno, íleo de todas as aves infectadas (I e I/HS35). Estas colônias isoladas foram posteriormente confirmadas como sendo do tipo A pelo método de PCR multiplex. Em contraste, o *Clostridium perfringens* não foi encontrado no conteúdo do intestino das aves que não foram infectadas (N, T e T/HS35).

6.4 DISCUSSÃO

Relatos anteriores estabeleceram uma base bioquímica e molecular sólida para a comunicação bidirecional entre os sistemas neuroendócrinos e imune (BLALOCK; COSTA, 1989; BESEDOVSKY; DEL REY, 1996; BASSO et al., 2003; COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010). Sabe-se que os sistemas nervoso, imunológico e endócrino são modulados por uma miríade de receptores de citocinas, neurotransmissores, hormônios e neuropeptídeos. Além disso, moléculas anteriormente relatadas como produtos específicos de um desses sistemas, também têm sido encontradas nos outros. Por exemplo, citocinas podem ser sintetizadas no sistema nervoso central, enquanto que os hormônios, tais como ACTH e TSH, podem ser produzidos por células linfoides (BESEDOVSKY; DEL REY, 1991). Estas interações bidirecionais desempenham um papel importante não só na fisiologia destes sistemas, mas também em vários processos fisiopatológicos (ADER; COHEN; FELTEN, 1995). Embora estas relações sejam bem documentadas em mamíferos, alguns raros estudos são encontrados na literatura sobre interações neuroimunes em aves.

No presente estudo, focamos as relações entre o estresse térmico por calor, infecção por *C. perfringens* e mudanças na atividade do SNC de frangos de corte. Nossos resultados mostraram uma relação direta entre os efeitos do estresse por calor e a infecção pelo *C. perfringens* sobre a inflamação do intestino, os níveis séricos de corticosterona e a expressão de c-fos em áreas do SNC, fatos estes que podem ser compreendidos como relacionados à atividade do eixo HPA.

Mostrou-se que a infecção por *C. perfringens* foi capaz de alterar o comportamento dos frangos. Na verdade, ele aumentou a frequência de comportamento tipo sonolento e diminuiu a frequência de alimentação, de andar e o de arranque de penas nas aves do grupo I. Embora em menor magnitude, as alterações de comportamento observadas nos animais do grupo I foram também observadas nos animais do grupo T, isto é, naqueles que receberam somente o caldo tioglicolato. O tioglicolato é uma substância irritante que produz inflamação intestinal (NATHAN; ROOT, 1977). Assim, parece possível sugerir que as alterações comportamentais observadas nos animais dos grupos I e T sejam indicativas do comportamento doentio (CD). CD é caracterizado por alterações comportamentais

que são semelhantes às observadas nas aves dos grupos T e I. Estudos anteriores indicaram que o CD pode ser induzido por doenças entéricas, um fato que foi interpretado pelos autores como uma indicação da existência de uma interação do eixo cérebro-intestinal (GRENHAM et al., 2011). Citocinas, tais como IL-1 e IL-6, entre outras, são libertadas a partir do intestino inflamado e podem ser responsáveis pelas alterações comportamentais indicativas do CD atualmente reportadas nas aves nos grupos I e T. A dor visceral induzida por enterite já foi indicada como hipótese da transmissão pelo sistema neuroentérico da informação sensorial visceral, via nervo vago, para o SNC. Este efeito, em conjunto com a libertação de citocinas na mucosa entérica, tem sido relatado como capaz de induzir o CD (DANTZER et al., 2008). O CD em aves é caracterizado principalmente pela presença de aumento de padrões de comportamento tipo sonolento (GREGORY et al., 2009). A este respeito, a inflamação do intestino induzida pelo caldo tioglicolato pode ter liberado mediadores pró-inflamatórias da mucosa do intestino, tais como citocinas, como relatado em outros locais em contextos experimentais diferentes (GAUTIER et al., 2013).

Nossos dados também mostraram que o estresse térmico diminuiu algumas das mudanças comportamentais relatadas e induzidas por inflamação nos frangos. Em particular, a frequência de comportamento tipo sonolento em animais que receberam tioglicolato e foram infectados (grupos T/HS35 e I/HS35). Curiosamente, tal como mostrado na Figura 5, o estresse por calor reduziu a inflamação intestinal, um efeito que está de acordo com o descrito anteriormente por nosso grupo (CALEFI et al., 2014). Em conjunto, os nossos dados sugerem a existência de uma relação interessante entre a intensidade da inflamação no intestino e o comportamento dos frangos doentes.

Como esperado a partir da infecção com o *C. perfringens* (CALEFI et al., 2014), observamos intensa inflamação, caracterizada pela presença de escores mais altos de necrose e inflamação e um aumento do número de células polimorfonucleares e mononucleares, nas aves do grupo I. Os sinais de inflamação dos frangos do grupo I, no entanto, foram reduzidos pelo estresse térmico por calor (grupo I/HS35), um efeito que é consistente com os dados comportamentais discutidos acima. Parece pertinente afirmar que, no presente estudo, o estresse térmico não foi capaz de alterar os parâmetros inflamatórios aqui relatados nas aves dos grupos que ingeriram o caldo tioglicolato (grupos T e T/HS35), indicando a

importância da infecção bacteriana para os efeitos do estresse térmico por calor sobre a inflamação do intestino. A este respeito, a necrose intestinal induzida pelo tioglicolato por si só, pode ter prejudicado as barreiras físicas nos intestinos, uma condição que é desejável para a infecção por *C. perfringens* e a produção de toxinas pela bactéria (GRENHAM et al., 2011; CALEFI et al., 2014). As alterações intestinais derivadas do processo infeccioso podem levar a uma ativação de neurônios no SNC. Para determinar tais ativações são empregadas técnicas para avaliação de proteínas que são produzidas durante a ativação cerebral.

Genes precoces imediatos celulares (IEGs) respondem à estimulação transsináptica e a atividade elétrica de membrana em células neurais; a transcrição de IEGs é ativada rapidamente e transitoriamente poucos minutos após a estimulação (GREENBERG; ZIFF; GREENE, 1986). O proto-oncogene c-fos foi um dos primeiros IEGs identificados (BARTEL et al., 1989) como membro representativo desta família. Nossos dados mostraram que o estresse térmico e a inflamação afetaram de forma diferencial a expressão de c-fos no PVN, GP, POM e Amy dos frangos. Como representado na Figura 6, o estresse térmico induziu um grande aumento na expressão de c-fos no PVN, enquanto o *C. perfringens* aumentou este parâmetro no GP. Este último efeito parece estar causalmente relacionado com a infecção bacteriana porque a expressão de c-fos nos animais do grupo T manteve-se inalterada no GP. Entretanto, nossos resultados também sugerem um efeito para a inflamação do intestino por si só; de fato, a expressão de c-fos nos animais do grupo T foi mais elevada do que a expressão observada nas aves do grupo controle (N), tanto no PVN como na POM. Em contraste, quase não se observaram alterações na expressão de c-fos na Amy entre os diferentes grupos.

Os efeitos de estresse térmico observados sobre a expressão de c-fos nos animais que receberam o caldo tioglicolato (T/HS35) e/ou foram infectados (I/HS35) diferiram de acordo com a região do cérebro estudada. Como pode ser visto na Figura 6, o estresse por calor aumentou os efeitos do tioglicolato e do *C. perfringens* sobre a expressão de c-fos no PVN, e este efeito foi maior nos animais infectados (grupo I/HS35). Por outro lado, o estresse térmico diminuiu os efeitos induzidos pelo *C. perfringens* na expressão de c-fos no GP e na Amy e não teve qualquer efeito no POM. Um efeito semelhante sobre a expressão de c-fos foi observado para o tioglicolato na POM e na Amy. Assim, o estresse térmico, o *C. perfringens* e o caldo tioglicolato afetaram a expressão de c-fos nos núcleos cerebrais dos frangos de

forma diferenciada. De qualquer forma, eles apontam claramente para um aumento da atividade neuronal.

A exposição a estressores ativa o eixo HPA e resulta em uma elevação facilmente perceptível nos níveis de corticosterona no plasma (AXELROD; REISINE, 1984). No presente experimento, tanto o tioglicolato como o *C. perfringens* aumentaram os níveis séricos de corticosterona em relação ao medido nos animais do grupo controle (grupo N; Figura 7). Assim, parece-nos indiscutível que a inflamação do intestino tenha induzido uma resposta ao estresse nos frangos. Este achado concorda com e reforça relatos anteriores sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias em processos inflamatórios ou doenças entéricas. No entanto, a continuidade e a intensidade da ativação do eixo HPA pode levar a um *feedback* negativo sobre a produção e liberação de corticosterona. Assim, os animais cronicamente e intensamente estressados poderiam apresentar menores níveis de corticosterona quando comparados com os animais do grupo controle (grupo N; Figura 7). Estes efeitos foram observados em relação aos níveis de corticosterona sérico dos animais dos grupos T/HS35 e I/HS35 em relação aos dos grupos I e T, respectivamente (Figura 7). De forma interessante, outros estudos demonstraram que o calor intermitente *per se* aumenta significativamente os níveis séricos de corticosterona em aves.

Em conclusão, utilizando-se um modelo experimental projetado para explorar as interações entre os sistemas imunológico e nervoso, mostramos claras relações entre inflamação intestinal, padrões de comportamento, níveis séricos de corticosterona e mudanças na atividade do SNC. Nossos dados apontam para a necessidade de futuros estudos que busquem compreender não apenas a relevância das interações cérebro-intestinais na manutenção da homeostase intestinal, mas também sua importância em produção animal.

7 EFEITOS DO ESTRESSE POR CALOR SOBRE A HISTOPATOLOGIA E MORFOMETRIA INTESTINAL, PRODUÇÃO DE CORTICOSTERONA E DE IMUNOGLOBULINAS EM FRANGOS DE CORTE INFECTADOS POR *Clostridium perfringens* TIPO A COM OU SEM CO-INFECÇÃO POR *Eimeria* spp.

7.1 INTRODUÇÃO

Estresse térmico por calor pode ser definido como o aumento da temperatura ambiental acima daquela considerada como de conforto térmico para a espécie; para as aves de corte com 19 dias de vida ela varia de 25 a 28 °C. Mostrou-se que o desconforto térmico reduz os índices zootécnicos, modula o sistema imune e diminui o bem estar animal (DAWKINS; DONNELLY; JONES, 2004; SOLEIMANI et al., 2011; QUINTEIRO-FILHO et al., 2012b). Mostrou-se nos EUA que o estresse por calor gera, na produção avícola, uma perda anual aproximada de 123 milhões de dólares (ST-PIERRE; COBANOV; SCHNITKEY, 2003). Além disso, sabe-se que estresse térmico é capaz de modular a resposta dos animais a agentes infecciosos, comprometendo a saúde do plantel e causando riscos à saúde pública (LARA; ROSTAGNO, 2013).

A preocupação com o bem estar animal na produção avícola fez com que alguns países delineassem diretrizes adequadas aos sistemas de criação (VAN HORNE; ACHTERBOSCH, 2008). Em um contexto diferente, medidas para a redução ou proibição do uso de antimicrobianos têm sido adotadas para proteger o consumidor da presença de bactérias resistentes a estes medicamentos (CASTANON, 2007). No entanto, embora aparentemente díspares, a associação destas medidas têm sido relacionada à reemergência de algumas doenças como, por exemplo, da enterite necrótica (NE) (SHANE, 2005).

A NE é uma doença cujo agente etiológico é o *C. perfringens* tipo A; entretanto, o desenvolvimento de quadros clínicos de NE depende de diversos fatores, tais como co-infecção por *Eimeria*, ingestão de rações tendo o trigo e cevada como base e/ou altas concentrações de proteína (PARISH, 1961b;

SHOJADOOST; VINCE; PRESCOTT, 2012). A necessidade da associação de diversos fatores para a ocorrência da NE resultou na existência de uma ampla variedade de modelos experimentais destinados a reproduzir a doença de forma semelhante ao que ocorre no campo (LONG, 1973; KALDHUSDAL et al., 1999; TIMBERMONTA et al., 2011; SHOJADOOST; VINCE; PRESCOTT, 2012).

Embora seja conhecido que a NE possua aspectos multifatoriais, poucos estudos foram feitos, até o momento, para determinar a participação de estressores na patogênese da NE. Calefi et al. (2014) verificaram que o estresse por calor reduziu as lesões intestinais causadas pela infecção do *C. perfringens*. Por sua vez, Calefi et al. (2016b) confirmaram a existência de uma redução da inflamação heterofílica e das lesões intestinais em animais estressados por calor em um modelo de NE; estes autores também mostraram que o tioglicolato (MFT) usado na preparação do caldo de cultura administrado por via oral aos animais e/ou a infecção por *C. perfringens per se*, modularam o eixo cérebro-intestino. Tsiouris et al. (2015a,b) verificaram, em um modelo experimental de NE que empregou co-infecção por *Eimeria* spp., que o estresse por frio e a alta densidade populacional são agentes predisponentes ao desenvolvimento da NE.

O objetivo do presente trabalho foi verificar os efeitos do estresse por calor sobre a lesão intestinal e a liberação de imunoglobulinas secretórias intestinais em um modelo experimental de co-infecção por *C. perfringens* e *Eimeria* spp. Mais especificamente, para melhor elucidar os efeitos de estressores no desenvolvimento da enterite necrótica aviária, avaliamos desta feita os efeitos do estresse térmico por calor intermitente aplicado em frangos de corte infectados experimentalmente com cepa patogênica de *C. perfringens* tipo A e co-infectados com *Eimeria* spp.; avaliamos ainda nos frangos, os níveis séricos de corticosterona, os níveis de sIgA no lavado intestinal, a intensidade das lesões histopatológicas intestinais, a morfometria intestinal e a invasibilidade dos estádios de *Eimeria* spp.

7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

7.2.1 Animais

Oitenta frangos de corte da linhagem Cobb 500[®], machos, adquiridos de incubatório comercial com 1 dia de vida foram alojados em piquetes de 1 m² com cama de maravalha previamente esterilizada. Os boxes foram dispostos de forma tal a isolar as aves dos diferentes grupos experimentais. As aves receberam água *ad libitum* e comida que não continha quaisquer aditivos que pudessem interferir com o desenvolvimento da *Eimeria* spp. e do *Clostridium perfringens*. Manteve-se um ciclo claro/escuro foi de 12/12 h, com luzes acesas às 7:00 h. Os animais foram mantidos e utilizados de acordo com as orientações e aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil (nº 3071/2013).

7.2.2 Formação de grupos

No dia experimental 1 (ED1), os frangos foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos de dez animais cada, sendo eles: grupo controle (C); grupo de animais infectados por *Eimeria* spp. (Ei); grupo de animais infectados com *C. perfringens* (Cp); grupo de animais co-infectados com *C. perfringens* e *Eimeria* spp. (Cp+Ei); grupo controle estressado por calor (C/HS34); grupo de animais infectados por *Eimeria* spp. e estressados por calor (Ei/HS34); grupo de animais infectados com *C. perfringens* e estressados por calor (Cp/HS34); grupo de animais co-infectados com *C. perfringens* e *Eimeria* spp. e estressados por calor (Cp+Ei/HS35).

7.2.3 Protocolo de estresse por calor

Os frangos dos grupos estressados por calor (C/HS34, Ei/HS34, Cp/HS34, Cp+Ei/HS35) foram mantidos à temperatura ambiente de $34 \pm 1^\circ\text{C}$ do ED17 ao ED23. Durante este período, as aves não estressadas por calor (C, Cp, Ei, Cp+Ei) foram mantidas a temperaturas ambientes compatíveis com aquelas recomendadas para a linhagem.

7.2.4 Protocolo de infecção por *Eimeria* spp.

Os animais receberam a vacina viva atenuada BioCoccivet-R (Biovet, SP, Brasil), por gavagem, em uma concentração de 30 vezes maior que aquela recomendada pelo fabricante no ED18 (grupos Ei, Cp+Ei, Ei/HS35, Cp+Ei/HS35). Lembra-se que esta vacina contém oocistos vivos de cepas precoces de *Eimeria* *acervulina*, *E. Brunetti*, *E. hagani*, *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. mivati*, *E. maxima* e *E. praecox*.

7.2.5 Preparo do inóculo e protocolo de infecção por *C. perfringens*

O presente protocolo experimental foi estabelecido anteriormente por Calefi et al. (2014). Foi utilizada uma cepa patogênica de *C. perfringens* tipo A (cepa CP8.2, genótipo para produção das toxinas Tpel e α). Esta cepa bacteriana vem sendo mantida em nossos laboratórios em glicerol a -80°C . O inóculo foi preparado seguindo-se o procedimento descrito por Cooper e Songer (2010). Resumidamente, o inóculo foi preparado por meio de dois cultivos alternados em meio caldo tioglicolato (Becton, Dickinson and Company, MD, EUA) com 2% de extrato de levedura (Becton, Dickinson and Company) e meio de carne cozida (Becton, Dickinson and Company). As bactérias (1×10^8 ufc/mL) foram oferecidas para os frangos do ED15 ao ED19 em comedouros de alumínio, em uma concentração final de aproximadamente 1×10^4 ufc/mL.

Do ED1 a ED23, os animais receberam ração orgânica para frangos de corte com teor de proteína bruta de 24%. A partir do ED19 os animais dos grupos (Cp, Cp+Ei, Cp/HS35, Cp+Ei/HS35) receberam o meio de cultura contendo a cepa patogênica de *C. perfringens* tipo A misturado à ração na proporção 1:1 (v/v). As aves dos grupos controle (C e C/HS35) foram alimentadas apenas com ração. A infecção ocorreu pela ingestão voluntária de alimento contendo o meio de cultura BHI contendo o *C. perfringens*. O volume de inóculo foi padronizado para que fosse consumido completamente dentro de um prazo máximo de 6 horas.

7.2.6 Quantificação de corticosterona livre e total

Amostras de sangue foram coletadas das veias braquial dos animais de todos os grupos no ED23; os soros foram obtidos, sendo usados para a quantificação hormonal. Os níveis de corticosterona foram quantificados por kit de ELISA comercial (Ensaio Arbor, Michigan, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, precedidos por diluições padronizadas. A concentração de corticosterona livre foi determinada pela concentração de corticosterona que não estava ligada às proteínas plasmáticas; a corticosterona total foi quantificada por meio da determinação de sua concentração após dissociação das proteínas plasmáticas. A corticosterona no soro foi medida por interpolação em uma curva padrão expressa em picogramas por mililitro de corticosterona no soro (pg/mL); os resultados foram multiplicados pelo fator de diluição utilizado no teste.

7.2.7 Quantificação dos níveis de IgA no lavado intestinal

Foram obtidas no ED 23 seções de 4 cm do duodeno (antes da flexão duodenal), jejuno (entre a porção final do duodeno e divertículo de Meckel) e íleo (entre o divertículo de Meckel e junção íleo-ceco-cólica). A lavagem do lumen intestinal foi realizada utilizando-se 5 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,2, 0,01 M) com 0.9 % NaCl, 1 mM de fenil, metil, sulfonil, fluoreto (PMSF)

e 0,1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Os conteúdos de lavagem recuperados foram centrifugados a 10000 g por 10 min a 4°C, sendo o sobrenadante obtido recolhido e armazenado a -20° C até a realização da quantificação. As concentrações de imunoglobulinas secretórias (sIgA) foram determinadas empregando kits comerciais de ELISA (Bethyl Laboratórios, Montgomery, EUA). A concentração foi expressa em microgramas por mililitro de solução de lavado ($\mu\text{g/mL}$); os resultados foram multiplicados pelo fator de diluição utilizado no teste.

7.2.8 Determinação do escore lesional microscópico

Para o diagnóstico das lesões e comparação dos achados entre os grupos de aves, toda a área de três seções intestinais transversais de cada porção intestinal (duodeno, jejuno e íleo) foi avaliada para necrose, inflamação (infiltrado de heterofilos no vilo e na cripta e infiltrado mononuclear), fusão das vilosidades, congestão, edema e hemorragia. Cada tipo de lesão foi classificado como leve (escore 1), moderado (escore 2) e marcante a grave (escore 3) para necrose, inflamação, congestão, edema e hemorragia conforme sugerido por Calefi et al. (2014). A fusão das vilosidades também foi pontuada como (1): inferior a 3 fusões por secção histológica; (2): entre 3 a 6 vilosidades fusionadas por secção histológica; e (3): mais de 6 vilosidades fusionadas por secção histológica. Foi, também, contado o número de animais que apresentavam abscessos e lesões transmuralis nas porções intestinais avaliadas.

7.2.9 Morfometria intestinal

No ED23, seções de 2 cm do duodeno (anterior a flexura duodenal), jejuno (entre a porção distal do duodeno e divertículo de Meckel) e íleo (entre o divertículo de Meckel e junção íleo-ceco-cólica) foram excisadas e fixadas em formol a 10% durante 48 horas; subsequentemente, os materiais foram embebidos em parafina segundo procedimento padrão usado em nossos laboratórios para a inclusão de

tecidos. Cortes transversais de 5 µm foram corados com HE para realização das mensurações.

Para a quantificação do tamanho dos vilos e criptas, três campos aleatórios de cada porção intestinal foram fotografados em aumento de 40x por meio de microscopia óptica de campo claro. Através do software ImageJ (SCHEINER, 2012), foram mensuradas as alturas de 10 vilos e a profundidade das respectivas 10 criptas para cada porção do intestino delgado (duodeno, jejuno, íleo) retirada de cada um dos animais dos diferentes grupos. A determinação da relação vilo:cripta foi realizada dividindo-se a altura do vilo pela profundidade de sua respectiva cripta.

7.2.10 Quantificação dos estádios de *Eimeria* spp. intracelular intestinal

Os mesmos preparados histológicos empregados para a realização da morfometria intestinal foram utilizados para a quantificação dos estádios de *Eimeria* spp.; esta quantificação foi realizada contando-se o número de macrogamontes, microgamontes jovens, microgamontes maduros contendo microgametas, zigoto intracelular ou oocisto jovem e oocisto maduro com parede aparente contidos nos vilos das porções intestinais. Somente foram considerados os estádios intracelulares. Em cada amostra, foram avaliados três campos aleatórios sob o aumento de 400x por microscopia óptica de campo claro.

7.2.11 Análise estatística

Os dados paramétricos foram analisados por meio de análise de variância multivariada (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas (TukeyHSD). Os resultados não paramétricos foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post hoc* de Dunn para correção das comparações entre os grupos (PEREIRA, 2010). Para a realização dos *heatmaps*, determinação dos *clusters* e cálculo da distância euclidiana para o desenho dos dendogramas foi utilizada a função *heatmap.2* do pacote *gplots* (versão 2.12.1) empregando-se o

software estatístico R versão 3.1.2. Foram consideradas significantes as análises com $P \leq 0,05$.

7.3 RESULTADOS

7.3.1 Quantificação de corticosterona livre e total

O estresse por calor aumentou significativamente os níveis de corticosterona livre nos animais do grupo C/HS34 em relação aos animais do grupo C (Figura 11A). O mesmo não foi observado quanto aos níveis de corticosterona total (Figura 11B). Com exceção dos animais infectados por *C. perfringens* (Grupo Cp), todos os animais dos demais grupos (C/HS34, Ei, Ei/HS34, Cp/HS34, Ei+Cp, Ei+Cp/HS34) apresentaram maiores níveis de corticosterona livre no soro quando comparados aos medidos nos animais dos grupos controles (Grupo C; $P < 0,05$; Figura 11A). Por sua vez, somente os animais do grupo Ei/HS34 apresentaram níveis maiores de corticosterona quando comparados aos animais do grupo C (Figura 11B).

Figura 11 - Quantificação dos níveis séricos de corticosterona livre e total

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: As diferentes letras sobre as barras com mediana e valores interquartis indicam diferenças significantes com $P < 0.05$ (Kruskal-Wallis para comparações múltiplas). A – concentração sérica de corticosterona livre ($P < 0.001$). B – concentração sérica de corticosterona total ($P < 0.05$). Grupo controle (C); grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp. /HS35 indica o grupo estressado por calor.

7.3.2 Quantificação dos níveis de IgA no lavado intestinal

O estresse por calor produziu uma tendência para aumento dos níveis de sIgA medidos no duodeno (Figura 12A) em relação aos níveis de sIgA medidos no lavado intestinal dos animais do grupo C. Efeito oposto foi observado no jejuno e no íleo, com redução da concentração de sIgA nos lavados provenientes dos animais dos grupos co-infectados infectados (Ei+Cp/HS34) com *Eimeria* (Ei/HS34) e estressados comparados aos dos animais dos grupos controles (grupo C; Figura 12 B e C). Os animais do grupo Cp apresentaram níveis semelhantes de sIgA no jejuno e aumento significativo da mesma no íleo quando comparados aos dos animais do grupo C (Figuras 12B e C).

Figura 12 - Quantificação dos níveis de IgA secretória no duodeno, jejuno e íleo de frangos de corte

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: As diferentes letras sobre as barras com médias e erro padrão indicam diferenças significantes com $P < 0.05$ (ANOVA de uma via seguido pelo teste de TukeyHSD). A – concentração de sIgA no lavado do duodeno ($P < 0.05$). B – concentração de sIgA no lavado do jejuno ($P < 0.0001$). C – concentração de sIgA no lavado do íleo ($P < 0.0001$). Grupo controle (C); grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp. /HS35 indica o grupo estressado por calor.

7.3.3 Determinação do escore lesional microscópico

A infecção por *Eimeria* spp. (Grupo Ei) produziu necrose, fusão de vilos e infiltrado inflamatório do tipo discreto a moderado (Tabela 9), observando-se, ainda, no intestino delgado dos frangos de corte ocorrência de abscessos de cripta e lesão transmural (Tabela 10). A infecção isolada por *C. perfringens* (grupo Cp) produziu

necrose, fusão de vilos e infiltrado inflamatório classificado como sendo de discreto a ausente no intestino dos animais (Tabela 9). Por sua vez, a co-infecção (grupo Ei+Cp) causou uma mortalidade de 10% dos animais, tendo-se observado a ocorrência de necrose, fusão de vilos e infiltrado inflamatório de moderado a grave, com ocorrência de abscesso e lesão transmural (Tabelas 9 e 10) no intestino delgado dos frangos de corte deste grupo experimental. O estresse por calor reduziu os escores de lesão nos animais do grupo Ei/HS34 e Ei+Cp/HS34 quando comparados aos dados obtidos nos animais não estressados dos grupos Ei e Ei+Cp (Tabela 9). Dessa forma, os animais do grupo Ei/HS34 apresentaram menor número de abscessos e de lesão transmural no duodeno quando comparados aos animais do grupo Ei (Tabela 10). No entanto, o estresse por calor aumentou a ocorrência de abscessos e de lesão transmural no jejuno e no íleo dos animais dos grupos Ei/HS34 e Ei+Cp/HS34 quando comparados aos animais dos grupos Ei e Ei+Cp respectivamente (Tabela 10).

Tabela 4 - Escores de lesão histopatológica do duodeno, jejuno e íleo (mediana [max/min])

(continua)								
	C	C/HS34	Ei	Ei/HS34	Cp	Cp/HS34	Ei+Cp	Ei+Cp/HS34
Duodeno	Necrose	0 ^a (0/0)	0 ^a (1/0)	2 ^b (2/1)	1 ^{a,b} (2/0)	0 ^a (0/0)	0 ^{a,c} (1/0)	2 ^b (3/0)
	Fusão de Vilos	0 ^a (0/0)	0 ^a (1/0)	1 ^b (2/1)	0 ^{a,b} (2/0)	0 ^{a,b} (0/0)	0 ^b (0/0)	2 ^b (3/0)
	Infiltrado de Heterófilos nos vilos	0 ^a (0/0)	0 ^a (1/0)	1 ^b (2/1)	1 ^{a,b} (2/0)	0 ^a (1/0)	0 ^{a,c} (1/0)	2 ^b (3/1)
	Infiltrado de Heterófilos na cripta	0 ^a (0/0)	0 ^a (1/0)	1 ^b (2/0)	1 ^{a,b} (2/0)	0 ^{a,b} (1/0)	0 ^{a,b} (1/0)	2 ^b (3/0)
	Infiltrado Mononuclear	0 (0/1)	0 (0/1)	2 (2/2)	2 (1/1)	1 (1/0)	1 (2/0)	2 (3/1)
	Necrose	0 ^a (0/0)	0 ^{a,c} (1/0)	1 ^b (1/1)	1 ^b (2/1)	0 ^{a,b} (0/0)	0 ^{b,c} (1/0)	2 ^b (3/1)
	Fusão de Vilos	0 ^a (0/0)	0 ^a (0/0)	0 ^{a,b} (2/0)	0 ^{a,b} (2/0)	1 ^{a,b} (0/0)	0 ^a (0/0)	2 ^b (3/1)
Jejuno	Infiltrado de Heterófilos nos vilos	0 ^a (0/0)	0 ^a (0/0)	0 ^{a,b} (2/0)	1 ^{a,b} (2/0)	1 ^{a,c} (1/0)	1 ^{a,b} (2/0)	2 ^b (3/1)

		(conclusão)							
		C	C/HS34	Ei	Ei/HS34	Cp	Cp/HS34	Ei+Cp	Ei+Cp/HS34
Íleo	Infiltrado de Heterófilos na cripta	0 ^a	0 ^a	0 ^{a,b}	1 ^{a,b}	1 ^{a,c}	1 ^{a,b}	2 ^b	1 ^{b,c}
		(0/0)	(0/0)	(2/0)	(2/0)	(1/0)	(1/0)	(3/0)	(2/0)
	Infiltrado Mononuclear	0 ^a	0 ^a	2 ^{b,c}	2 ^b	1 ^{a,c}	1 ^{a,b}	2 ^b	2 ^b
		(0/0)	(1/0)	(2/1)	(3/2)	(1/0)	(2/0)	(3/1)	(2/2)
	Necrose	0 ^a	0 ^a	1 ^b	1 ^b	0 ^{a,c}	0 ^a	2 ^b	1 ^{a,b,c}
		(0/0)	(0/0)	(2/0)	(2/0)	(0/0)	(1/0)	(3/1)	(2/0)
	Fusão de Vilos	0 ^a	0 ^a	1 ^{a,b}	0 ^{a,b}	0 ^a	0 ^a	2 ^b	0 ^{a,b}
		(0/0)	(2/0)	(1/0)	(2/0)	(0/0)	(0/0)	(3/1)	(1/0)
	Infiltrado de Heterófilos nos vilos	0 ^a	0 ^a	1 ^{a,b}	0 ^{a,b}	0 ^a	0 ^a	2 ^b	1 ^{a,b}
		(0/0)	(0/0)	(1/0)	(1/0)	(1/0)	(1/0)	(3/0)	(2/0)
	Infiltrado de Heterófilos na cripta	0 ^a	0 ^a	1 ^{a,b}	0.5 ^{a,b}	0 ^a	0 ^a	2 ^b	1 ^{a,b}
		(0/0)	(0/0)	(1/0)	(1/0)	(1/0)	(1/0)	(3/0)	(1/0)
Infiltrado Mononuclear	0 ^a	0 ^a	1 ^b	1.5 ^b	1 ^{a,b}	1 ^{a,b}	2 ^b	1.5 ^b	
	(0/0)	(1/0)	(2/1)	(2/1)	(1/0)	(1/0)	(3/1)	(2/1)	

Fonte: (CALEFI, 2016)

Nota: As diferentes letras sobre as medianas indicam diferenças significantes com $P < 0.05$ (Kruskal-Wallis de uma via seguido pelo teste de comparações múltiplas. Grupo controle (C); grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp. /HS35 indica o grupo estressado por calor.

Tabela 5 - Frequência de ocorrência de abscesso, úlcera e lesão transmural no Duodeno, Jejuno e Íleo

(continua)								
	C	C/HS34	Ei	Ei/HS34	Cp	Cp/HS34	Ei+Cp	Ei+Cp/HS34
Duodeno								
Abscesso	0	0	5	1	0	0	1	1
Lesão transmural	0	0	6	0	0	0	0	1
Jejuno								
Abscesso	0	0	0	0	0	1	2	4
Lesão transmural	0	0	1	3	0	0	1	6

	(conclusão)							
	C	C/HS34	Ei	Ei/HS34	Cp	Cp/HS34	Ei+Cp	Ei+Cp/HS34
Íleo								
Abscesso	0	0	0	0	0	0	2	1
Lesão transmural	0	0	0	2	0	0	0	2

Fonte: (CALEFI, 2016)

Nota: Grupo controle (C); grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp. /HS34 indica o grupo estressado por calor.

7.3.4 Morfometria intestinal

A infecção por *Eimeria* spp. (grupo Ei) e a co-infecção de *Eimeria* spp. com *C. perfringens* (grupo Ei+Cp) diminuíram de forma significativa a altura dos vilos, aumentando a profundidade das criptas no duodeno, jejuno e íleo em relação aos dos animais do grupo C (Figura 13). Os animais que receberam somente *C. perfringens* (Grupo Cp) apresentaram altura de vilos no duodeno, jejuno e íleo semelhante àquela observada nos dos animais do grupo C. No entanto, a média de profundidade de cripta e a relação vilo:cripta no jejuno dos animais do grupo Cp foi estatisticamente maior que aquela medida nas aves do grupo C.

O estresse por calor aplicado aos animais infectados ou não aumentou de forma significativa a altura dos vilos e das criptas nas porções intestinais avaliadas. Por sua vez, a relação vilo:cripta mostrou uma tendência a menores valores nos animais estressados por calor quando comparados aos dados medidos naqueles não estressados.

Figura 13 - Análise morfométrica dos vilos, criptas e relação vilo:cripta do duodeno, jejuno e íleo

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: As diferentes letras sobre as barras com médias e erro padrão indicam diferenças significativas com $P < 0.05$ (ANOVA de uma via seguido pelo teste de TukeyHSD). Linhas contínuas separam os gráficos por porção intestinal (duodeno, jejuno e íleo). Linhas tracejadas separam os gráficos por região analisada (vilo, cripta e vilo:cripta). Grupo controle (C); grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp. /HS35 indica o grupo estressado por calor.

7.3.5 Quantificação dos estádios de *Eimeria* spp. intracelular intestinal

Avaliação histológica intestinal mostrou que todos os animais que receberam a vacina contendo oocistos de *Eimeria* spp. foram infectados com sucesso. Não

foram encontradas diferenças quanto ao número de microgamontes, macrogamontes e microgametócitos no duodeno, jejuno e íleo entre os animais dos grupos Ei e Ei+Cp (Tabela 8). No entanto, observou-se que o estresse por calor (grupos Ei/HS34 e Ei+Cp/HS34) reduziu as contagens de microgamontes, macrogamontes e microgametócitos de forma significativa em quase todas as porções intestinais quando comparadas àquelas medidas nos animais do grupo Ei/HS34 e Ei+Cp/HS34 (Tabela 8).

Tabela 6 - Quantificação dos estádios de *Eimeria* spp. no duodeno, jejuno e íleo (mediana [max/min])

Porção	Estádio	Ei	Ei/HS34	Ei+Cp	Ei+Cp/HS34
Duodeno	Microgamontes	4 ^a	0 ^b	4 ^a	0 ^b
		(36/0)	(4/0)	(32/0)	(6/0)
	Macrogamontes	4.5 ^a	0 ^b	0 ^a	3 ^b
		(18/0)	(4/0)	(19/0)	(4/0)
	Merozoítos	0 ^{a,b}	0 ^a	0 ^b	1 ^{a,b}
		(5/0)	(2/0)	(10/0)	(12/0)
Jejuno	Microgamontes	3 ^{a,b}	7 ^a	4 ^{a,b}	2 ^b
		(27/0)	(16/0)	(8/1)	(13/0)
	Macrogamontes	5 ^a	2 ^b	5 ^a	1 ^b
		(10/0)	(6/0)	(13/1)	(4/0)
	Merozoítos	2 ^{a,b}	3 ^b	2 ^{a,b}	1 ^b
		(7/0)	(6/0)	(5/0)	(4/0)
Íleo	Microgamontes	1 ^a	4 ^b	2 ^a	2 ^a
		(6/0)	(10/1)	(15/0)	(7/0)
	Macrogamontes	2 ^a	2 ^{b,c}	4 ^a	1 ^c
		(10/0)	(5/0)	(12/1)	(4/0)
	Merozoítos	1 ^a	0 ^b	1 ^{a,b}	0 ^{a,b}
		(5/0)	(3/0)	(3/0)	(4/0)

Fonte: (CALEFI, 2016)

Nota: As diferentes letras sobre as medianas indicam diferenças significantes com $P < 0.05$ (Kruskal-Wallis de uma via seguido pelo teste de comparações múltiplas. Grupo controle (C); grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp. /HS35 indica o grupo estressado por calor.

7.4 DISCUSSÃO

O calor é um estressor ambiental com efeitos prejudiciais à produção avícola; ele reduz o desempenho zootécnico (DONKOH, 1989), favorece infecções (QUINTEIRO-FILHO et al., 2012a), induz alterações no sistema imune (MASHALY et al., 2004) e reduz o bem estar animal (DEBUT et al., 2005).

Relatou-se que o estresse por calor ativa o eixo HPA aumentando os níveis séricos de corticosterona (QUINTEIRO-FILHO et al., 2012b). De fato, observamos neste trabalho que os níveis séricos de corticosterona livre foram maiores nos animais do grupo C/HS34 quando comparados aos de animais não estressados (grupo C; Figura 11). Da mesma forma, a infecção por *Eimeria* spp. ou sua co-infecção com *C. perfringens* aumentaram significativamente os níveis séricos de corticosterona livre, ou seja, o processo infeccioso intestinal *per se* atuou como estressor ativando o eixo HPA das aves. No entanto, as associações do estresse por calor com a infecção por *Eimeria* spp. ou com a co-infecção por *C. perfringens* atuaram de forma diferente; aumentaram os níveis séricos de corticosterona livre das aves acima dos valores observados nos animais do grupo C/HS35. Por sua vez, e conforme os nossos dados, a infecção isolada por *C. perfringens* não teve efeito estressor; possivelmente, tal fato esteja associado à necessidade de fatores predisponentes ao desenvolvimento do *C. perfringens* para o curso da NE (SHOJADOOST; VINCE; PRESCOTT, 2012). De fato, sem o processo de lesão tecidual e inflamação intestinal, os mediadores inflamatórios responsáveis pela ativação do eixo HPA não são liberados (ELENKOV; CHROUSOS, 2002) e, por conseguinte, os níveis séricos de corticosterona se manteriam próximos ao nível basal nas aves deste grupo (grupo Cp).

No presente estudo, os dados de corticosterona livre diferiram de forma marcante da concentração de corticosterona total sérica, no que diz respeito tanto às concentrações medidas quanto às diferenças observadas entre os grupos. Embora os dados demonstrem a existência de uma tendência para maiores concentrações de corticosterona total nos animais estressados por calor quando comparados aos não estressados, somente o grupo infectado com *Eimeria* apresentou média

significativamente superior ao grupo controle (grupo C). Possivelmente, a ausência de diferenças estatísticas esteja associada às relevantes variações na concentração de corticosterona total intragrupo, fato este não observado em relação aos níveis de corticosterona livre. Desta forma, quer nos parecer que a quantificação dos níveis de corticosterona livre e/ou total seja um fator determinante para a compreensão dos efeitos do estresse e das infecções sobre a atividade do eixo HPA.

Ausência de alterações nos níveis de corticosterona quando da infecção por *Eimeria* já foi relatada anteriormente por McFarlane e Curtis (1989); também já se observou que a associação da infecção por *Eimeria* com o estresse por calor ou com múltiplos estressores não aumentaram de forma significativa os níveis de corticosterona (MCFARLANE; CURTIS, 1989). De forma semelhante, Calefi et al. (2016a) observaram que a associação de estresse por calor com inflamação intestinal induzida pela ingestão de caldo tioglicolato e infecção por *C. perfringens* não aumentaram os níveis séricos de corticosterona quando comparados aos dos animais não estressados; porém, neste trabalho, os desafios intestinais aplicados isoladamente foram capazes de aumentar de forma significativa os níveis de corticosterona sérica. Estes fatos em seu conjunto sugerem que a medida dos níveis séricos de corticosterona pode não ser o melhor marcador do estresse.

Sabe-se que um aumento dos níveis de corticosterona em consequência de estressores ambientais reduz tanto a resposta imune inata como a adaptativa (FOWLES et al., 1993; EL-LETHEY; HUBER-EICHER; JUNGI, 2003). No entanto, alguns estudos têm mostrado que o estresse por calor melhora a resposta imune humoral intestinal tendo-se observado aumento da liberação de sIgA (STAR et al., 2007). Calefi et al. (2016b) por meio da quantificação de sIgA no lavado intestinal de frangos de corte estressados por calor mostraram uma redução dos níveis de sIgA. De forma análoga, observou-se neste trabalho uma redução na concentração de sIgA no jejuno e no íleo dos animais estressados por calor (Figura 12). Ainda assim, observou-se um aumento na concentração de sIgA no lavado intestinal do duodeno dos animais estressados por calor quando comparada àquela quantificada nos animais não estressados. Possivelmente, a sIgA quantificada no lavado duodenal tenha derivado da secreção biliar proveniente de sequestro plasmático, como sugerido por Rose et al. (1981); neste caso, esta ocorrência poderia ter sido facilitada pelo maior aporte sanguíneo decorrente das alterações hemodinâmicas

hepáticas produzidas pelo calor (AENGWANICH; SIMARAKS, 2004). Quer nos parecer, que as diferenças nas concentrações de sIgA no lavado intestinal não possam ser explicadas por variações ocorridas no infiltrado linfoplasmocítico, já que os animais estressados por calor não apresentaram quaisquer diferenças significantes quanto ao infiltrado inflamatório mononuclear quando comparados aos animais dos grupos não estressados (Tabela 9).

As alterações observadas no infiltrado inflamatório heterofílico, embora não significantes, indicam que os animais dos grupos co-infectados (grupo Ei+Cp) apresentaram escores de quantificação superiores aos dos animais co-infectados e estressados por calor (grupo Ei+Cp/HS34). Por conseguinte, observou-se uma redução dos escores máximos de necrose intestinal nos animais co-infectados e estressados (grupo Ei+Cp/HS34), bem como naqueles infectados por *Eimeria* (grupo Ei/HS34), quando comparados aos respectivos grupos não estressados (Ei+Cp e Ei). As mesmas tendências foram observadas anteriormente por Calefi et al. (2014) quanto à redução da inflamação heterofílica e da necrose intestinal nos animais infectados por *C. perfringens* e que ingeriram a substância inflamatória tioglicolato. No entanto, e de forma contrária ao relatado por Calefi et al. (2014) o presente experimento mostrou que o estresse por calor aumentou os escores máximos de necrose intestinal nos animais infectados somente com *C. perfringens* (grupo Cp). Neste contexto, de relevância recordar que no presente modelo experimental para a indução do modelo experimental de NE, ao invés do caldo tioglicolato utilizou-se o *C. perfringens* misturado ao meio BHI. Sendo assim, parece-nos que a redução da lesão intestinal observada nos animais infectados com *C. perfringens* neste experimento esteja restrita ao grupo co-infectado (grupo Ei+Cp). Em outras palavras, parece-nos que a redução da lesão tecidual esteja associada à diminuição dos efeitos nocivos do fator predisponente (*Eimeria* spp) ao desenvolvimento do *C. perfringens*. Provavelmente, a redução no desenvolvimento da NE descrita por Calefi et al. (2014) tenha sido consequência da diminuição do processo inflamatório decorrente do fator predisponente ao desenvolvimento do *C. perfringens*, ou seja, a ingestão do agente irritante tioglicolato.

Embora o estresse por calor tenha mostrado uma tendência para diminuir o processo inflamatório e a necrose no intestino delgado, observou-se um aumento do número de abscessos de cripta e de lesão transmural nos animais dos grupos

Ei/HS34 e Ei+Cp/HS34 em relação aos animais dos grupos não estressados (grupos Ei e Ei+Cp, respectivamente). Mesmo considerando-se o aumento das lesões na região das criptas intestinais, mostrou-se que a profundidade das criptas estava maior nos animais dos grupos estressados por calor quando comparados aos dos grupos não estressados. Quer nos parecer que estes aumentos possam ser atribuídos a uma maior atividade proliferativa das células das criptas, fato este evidenciado pelo aumento da altura das vilosidades intestinais dos animais estressados por calor quando comparados aos não estressados. Estas diferenças teriam se refletido em uma menor relação vilosidade:cripta, ou seja, os animais dos grupos estressados por calor teriam uma maior renovação do epitélio intestinal, como sugerido em outro contexto experimental por Uni, Platin e Sklan (1998); neste caso, a maior diferenciação celular seria proveniente da cripta. Estas alterações, acentuadas nos animais infectados, parecem independentes do processo infeccioso, como se depreende da comparação dos dados dos animais dos grupos C e C/HS34 (Figura 13).

O aumento que observamos na proliferação das células das criptas pode estar relacionado ao maior número de abscessos e de lesões transmuralis. Os animais dos grupos Ei/HS34 e Ei+Cp/HS34 apresentaram agregados de merozoítos, macrogametas e microgametas em alguns casos, acompanhados de infiltrado inflamatório linfoplasmocítico e heterofílico grave adjacente ao foco de infecção presente na cripta. Por algum motivo desconhecido, observou-se que os merozoítos de primeira geração nas aves destes grupos, apresentaram um tropismo pela cripta intestinal formando focos de infecção, enquanto que na maior parte do epitélio observou-se uma redução nas contagens de macrogamontes e microgamontes. Resultados semelhantes foram encontrados por Banfield (1998) ao submeter frangos infectados por *Eimeria* a um tipo de estresse crônico por calor; mostrou em seu estudo que o estresse diminuiu a contagem de oocistos nas fezes dos frangos em relação a animais não estressados. De fato, foi possível observar em nosso estudo, que o estresse por calor reduziu a formação de macro e microgametas no epitélio intestinal. Embora não saibamos precisar os mecanismos pelos quais o estresse por calor reduziu a infecção da *Eimeria*, ficou evidente que as alterações fisiológicas decorrentes do estresse são relevantes e quiçá mesmo centrais na patogênese das coccidioses.

Em síntese, quer nos parecer seja possível afirmar que o estresse por calor reduziu a infecção e/ou o desenvolvimento da *Eimeria* no epitélio intestinal que, por sua vez, diminuiu o potencial lesivo do *C. perfringens*. Desta forma, parece-nos possível inferir que o principal efeito do estresse na etiopatogênese da enterite necrótica aviária esteja diretamente relacionado, sendo dependente, da modulação dos efeitos de fatores predisponentes ao desenvolvimento do *C. perfringens*. Relevante ressaltar a importância prática dos presentes achados experimentais; de fato, em condições de campo são muito frequentes as co-infecções de *Eimeria* spp. com *C. perfringens*.

8 EFEITOS DO ESTRESSE POR CALOR SOBRE A PRODUÇÃO DE MONOAMINAS E DE SEUS METABÓLITOS NO CÉREBRO DE FRANGOS DE CORTE INFECTADOS POR *Clostridium perfringens* TIPO A COM OU SEM CO-INFECÇÃO POR *Eimeria* spp.

8.1 INTRODUÇÃO

Besedovsky et al. (1977b) mostraram, pela primeira vez, que o desafio imune de ratos com eritrócitos de ovelhas ativava neurônios hipotalâmicos. Neste trabalho, os autores sugeriram que a ativação do sistema imune aumenta o *turnover* de NOR no hipotálamo de ratos. Estudos como este marcaram o início das pesquisas relacionadas aos efeitos do sistema imune sobre a atividade do sistema nervoso.

Sabe-se, atualmente, que citocinas liberadas por leucócitos ativam neurônios no encéfalo. Neste sentido, as principais vias propostas para explicar o mecanismo pelo qual as citocinas ativam diferentes regiões do SNC não estão totalmente consolidadas. Sugere-se que elas estejam relacionadas: à penetração destas citocinas no SNC por locais onde existam aberturas na barreira hemato-encefálica, como por exemplo, nos órgãos circunventriculares; passagem das mesmas pela barreira hemato-encefálica via transportadores de membrana locais; ativação por elas produzida no sistema nervoso periférico aferente que, por sua vez, modificaria a atividade do SNC; pela ativação que produzem em células como, por exemplo, nas células endoteliais, que liberariam moléculas que atravessariam a barreira hemato-encefálica; e, finalmente, por meio da ativação de leucócitos que produziriam e liberariam as citocinas diretamente no SNC (ver, para detalhes, a revisão de DUNN, 2006).

A ativação do eixo HPA e a liberação hipotalâmica de ACTH se faz com participação da NOR e 5-HT; estas aminas, por sua vez, têm sido relacionadas às ativações neuroimunes periféricas, isto é, seriam desencadeadas em última instância pela liberação de IL-1, IL-6, TNF- α (TURNBULL; RIVIER, 1995). Neste contexto, sabe-se que a ativação do eixo HPA produz comportamento doentio em animais e no ser humano (LARSON; DUNN, 2001; GREGORY et al., 2009). A expressão do comportamento doentio está relacionada à diminuição da ingestão de

alimentos e aumento da sonolência com consequente perda de peso em aves (SCHROTT et al., 1998; JOHNSON, 2002).

A modulação do sistema imune pela ativação do SNC também é uma via importante para a manifestação dos efeitos do estresse (SELYE, 1936). Estressores físicos (temperatura ambiental) ou psicológicos (ruptura social) também são conhecidos por ativar o eixo HPA (EDENS; SIEGEL, 1975; SIEGEL, 1980). Estressores agudos aumentam as concentrações e o *turnover* de 5-HT hipotalâmicos; entretanto, a cronicidade do estresse e a sua periodicidade de ocorrência têm sido relacionados à diminuição que produzem nos níveis de 5-HT e de NOR e no aumento da concentração de 5-HIAA no hipotálamo, na ponte e na medula oblonga (MORGAN; KEVIN RUDEEN; PFEIL, 1975; KENNETT; DICKINSON; CURZON, 1985; ADELL et al., 1988).

Calefi et al. (2016b) mostraram, em aves, que o estresse por calor e a inflamação intestinal aumentaram a reatividade de neurônios em núcleos hipotalâmicos (PVN e POM) e diminuiu a ativação neuronal em um núcleo cerebral relacionado ao sistema límbico (amígdala). Alguns estudos conduzidos com aplicação de estresse crônico em mamíferos indicaram que a ativação do eixo HPA está relacionada a uma maior atividade em neurônios do PVN e da POM e, também, a uma quebra da conexão do sistema límbico com o córtex pré-frontal (CHAPPELL et al., 1986; AGUILERA, 1994; JOVANOVIĆ et al., 2011); estes achados mostram, de forma clara, a existência de uma modulação do SNC e, consequentemente do comportamento pelo sistema imune.

O presente trabalho analisa variações no perfil neuroquímico no córtex pré-frontal, hipotálamo, tronco encefálico e mesencéfalo de frangos de corte, após ativação do eixo cérebro-intestino pelo estresse crônico por calor e/ou pela infecção e co-infecção por *Eimeria* spp. e *C. perfringens* tipo A.

8.2 MATERIAIS E MÉTODOS

8.2.1 Animais

Frangos de corte com um dia de vida foram alojadas em salas climatizadas nas dependências da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil. Um total de 80 frangos de corte machos (Cobb 500[®]) foram mantidas em câmaras isoladoras (Alesco, São Paulo, Brasil), contendo filtros de ar com alta eficiência na separação de partículas (HEPA), desde o primeiro (ED1) até o último dia experimental (ED23). As aves receberam água *ad libitum* e foram alimentadas como descrito no item 7.2.6. A umidade relativa do ar foi monitorada e controlada (em não menos que 45%). Os animais foram mantidos e utilizados de acordo com as orientações e aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil (nº 3071/2013).

8.2.2 Formação de grupos

No dia experimental 1 (ED1), os frangos foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos de dez animais cada, sendo eles: grupo controle (C); grupo de animais infectados por *Eimeria* spp. (Ei); grupo de animais infectados com *C. perfringens* (Cp); grupo de animais co-infectados com *C. perfringens* e *Eimeria* spp. (Cp+Ei); grupo controle estressado por calor (C/HS34); grupo de animais infectados por *Eimeria* spp. e estressados por calor (Ei/HS34); grupo de animais infectados com *C. perfringens* e estressados por calor (Cp/HS34); grupo de animais co-infectados com *C. perfringens* e *Eimeria* spp. e estressados por calor (Cp+Ei/HS35).

8.2.3 Protocolo de estresse por calor

Os frangos dos grupos estressados por calor (C/HS34, Ei/HS34, Cp/HS34, Cp+Ei/HS35) foram mantidos à temperatura ambiente de $34 \pm 1^\circ\text{C}$ do ED17 ao ED23. Durante este período, as aves não estressadas por calor (C, Cp, Ei, Cp+Ei) foram mantidas em temperaturas ambientes compatíveis com aquelas recomendadas para a linhagem.

8.2.4 Protocolo de infecção por *Eimeria* spp.

No ED18, os animais receberam por gavagem a vacina viva atenuada BioCoccivet-R (Biovet, SP, Brasil), em uma concentração 30 vezes maior que aquela recomendada pelo fabricante (grupos Ei, Cp+Ei, Ei/HS35, Cp+Ei/HS35). Lembra-se que esta vacina contém oocistos vivos de cepas precoces de *Eimeria acervulina*, *E. brunetti*, *E. hagani*, *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. mivati*, *E. maxima* e *E. praecox*.

8.2.5 Preparo do inóculo e protocolo de infecção por *C. perfringens*

O presente protocolo experimental foi estabelecido anteriormente por Calefi et al. (2014). Foi utilizada uma cepa patogênica de *C. perfringens* tipo A (cepa CP8.2, genótipo para produção das toxinas Tpel e α). Esta cepa bacteriana vem sendo mantida em nossos laboratórios em glicerol a -80°C . O inóculo foi preparado seguindo-se o procedimento descrito por Cooper e Songer (2010). Resumidamente, o inóculo foi preparado por meio de dois cultivos alternados em meio caldo tioglicolato (Becton, Dickinson and Company, MD, EUA) com 2% de extrato de levedura (Becton, Dickinson and Company) e meio de carne cozida (Becton, Dickinson and Company). As bactérias (1×10^8 ufc/mL) foram oferecidas para os frangos do ED15 ao ED19 em comedouros de alumínio, em uma concentração final de aproximadamente 1×10^4 ufc/mL.

Do ED1 a ED23, os animais receberam ração orgânica para frangos de corte

com teor de proteína bruta de 24%. A partir do ED19 os animais dos grupos (Cp, Cp+Ei, Cp/HS35, Cp+Ei/HS35) receberam o meio de cultura contendo a cepa patogênica de *C. perfringens* tipo A misturada à ração na proporção 1:1 (v/v). As aves dos grupos controle (C e C/HS35) foram alimentadas apenas com ração. A infecção ocorreu pela ingestão voluntária de alimento contendo o meio de cultura BHI contendo o *C. perfringens*. O volume de inóculo foi padronizado para que fosse consumido completamente dentro de um prazo máximo de 6 horas.

8.2.6 Coleta e processamento dos tecidos cerebrais

Os animais foram submetidos a eutanásia por decapitação. Imediatamente após, o cérebro foi removido e o córtex pré-frontal, mesencéfalo, hipotálamo e tronco encefálico foram rapidamente dissecados a 4º C, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o uso. Os tecidos cerebrais foram homogeneizados em solução de ácido perclórico 0,1 M contendo 0,02% de Na₂S₂O₅, e uma concentração conhecida de 3,4 diidroxibenzilamina (DHBA) que foi utilizado como padrão interno. O homogenato foi centrifugado a 10000 g por 15 min sendo o sobrenadante retirado para a dosagem dos neurotransmissores.

8.2.7 Preparo das amostras e quantificação dos neurotransmissores

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) acoplado a um detector eletroquímico (HPLC-ED; Shimadzu Modelo 20A) para as quantificações neuroquímicas. O HPLC-ED é composto de um injetor automático com válvula injetora com volume variável entre 1 a 100µl, bombas de fluxo quaternária, sistema controlador, uma coluna cromatográfica medindo 150 X 4,6 mm, diâmetro (Shimpak – ODS C 18) com filtro de linha e um detector eletroquímico AntecDecade. A técnica utilizada foi de cromatografia em fase reversa com pareamento iônico, com temperatura de trabalho de 50°C. A fase móvel foi constituída de tampão citrato 0,02 M, metanol 92/8 (v/v), 0,12 nM EDTA sódico e 0,0556% de ácido 1-heptanosulfônico

(HSA). O pH foi ajustado em 2,64 por meio do uso de ácido ortofosfórico (H_3PO_4). O detector foi mantido em uma tensão de 0,8V no eletrodo.

Para o preparo das soluções padrões foram utilizados concentrações de 1 nM de ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), ácido 5-hidroindol, 3-acético (5-HIAA), dopamina (DA), serotonina (5-HT), noradrenalina (NOR), adrenalina (AD), ácido vanilmandélico (VMA) e 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG). Os padrões foram injetados no início e final de cada determinação e os coeficientes de variação foram sempre menores que 10%. Foram calculadas as relações DOPAC/DA, HVA/DA e 5-HIAA/5-HT como indicadores de *turnover* de DA e 5-HT.

8.2.8 Análise estatística

Para análise das tendências nas variações das médias dos neurotransmissores nas estruturas cerebrais removidas dos animais dos diferentes grupos experimentais, foram utilizados *heatmaps* feitos com o auxílio da função *heatmap.2* do pacote *gplots* (versão 2.12.1) empregando-se o software estatístico R versão 3.2.3. As médias das concentrações dos neurotransmissores das aves dos grupos experimentais foram centralizadas em relação às do grupo controle. Os *heatmaps* foram reorganizados em suas linhas e colunas para identificar semelhanças entre os neurotransmissores e foi baseado na distância euclidiana e método de aglomeração completa. As distâncias são representadas pelos dendogramas nos eixos x e y do gráfico.

8.3 RESULTADOS

8.3.1 Quantificação dos neurotransmissores nas estruturas cerebrais

Para melhor visualização das variações nos níveis de neurotransmissores, os dados foram apresentados por estrutura analisada (córtex pré-frontal, hipotálamo, mesencéfalo e tronco encefálico). Os dados brutos foram apresentados no Apêndice A.

8.3.1.1 Córtex pré-frontal

A Figura 14 ilustra que o aumento induzido pelo estresse nos níveis de 5-HT, DOPAC e da relação DOPAC/DA, e a diminuição que ele produziu nos níveis médios de NOR+AD. Os frangos dos grupos C/HS34, Ei/HS34 e Cp/HS34 apresentaram aumento de 5-HIAA quando comparados aos respectivos grupos não estressados; no entanto, o *turnover* de serotonina, avaliado pela relação 5-HIAA/5-HT foi maior somente nas aves dos grupos Cp/HS34 e Ei/HS34.

Figura 14 - Heatmap com as concentrações médias dos neurotransmissores no córtex pré-frontal

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: o heatmap foi colorido segundo escala de cores. Os dados foram normalizados em relação a média do grupo controle (C), seguido por normalização para cada neurotransmissor. Os agrupamentos de linhas e colunas foi feito para identificar semelhanças entre os neurotransmissores e foi baseado na distância euclidiana e método de aglomeração completa. As distâncias são representadas pelos dendogramas nos eixos x e y do gráfico. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

8.3.1.2 Hipotálamo

A Figura 15 ilustra o fato de que o estresse por calor aumentou os níveis médios de MHPG, HVA, HVA/DA, DOPAC/DA, 5HIAA/5HTe diminuiu os níveis médios de 5-HT e NOR+ADnas aves de todos os grupos. Os animais dos grupos C/HS35, Ei/HS35 e Cp/HS35 apresentaram redução de DOPAC quando comparados aos respectivos grupos não estressados por calor.

Figura 15 - Heatmap com as concentrações médias dos neurotransmissores no hipotálamo

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: o heatmap foi colorido segundo escala de cores. Os dados foram normalizados em relação a média do grupo controle (C), seguido por normalização para cada neurotransmissor. Os agrupamentos de linhas e colunas foi feito para identificar semelhanças entre os neurotransmissores e foi baseado na distância euclidiana e método de aglomeração completa. As distâncias são representadas pelos dendogramas nos eixos x e y do gráfico. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

8.3.1.3 Mesencéfalo

A Figura 16 ilustra os dados obtidos; depreende-se de sua leitura que o estresse por calor aumentou os níveis médios de MHPG, 5-HIAA/5-HT, DOPAC/DA, HVA/DA, e diminuiu os níveis médios de DA, NOR+AD e 5-HT nos frangos de todos os grupos. Os animais dos grupos C/HS35, Ei/HS35 e Cp/HS35 apresentaram redução de HVA quando comparados aos respectivos grupos não estressados por calor.

Figura 16 - Heatmap com as concentrações médias dos neurotransmissores no mesencéfalo

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: o heatmap foi colorido segundo escala de cores. Os dados foram normalizados em relação a média do grupo controle (C), seguido por normalização para cada neurotransmissor. Os agrupamentos de linhas e colunas foi feito para identificar semelhanças entre os neurotransmissores e foi baseado na distância euclidiana e método de aglomeração completa. As distâncias são representadas pelos dendogramas nos eixos x e y do gráfico. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

8.3.1.4 Tronco encefálico

A Figura 17 ilustra os dados obtidos; depreende-se da análise que o estresse por calor aumentou os níveis médios de MHPG, DOPAC, HVA, HVA/DA, DOPAC/DA, 5-HIAA/5-HT, e diminuiu os níveis médios de NOR+AD, 5-HT dos frangos de todos os grupos. Os animais dos grupos C/HS35, Ei/HS35 e Cp/HS35

apresentaram aumento na relação 5-HIAA/5-HT quando comparados aos respectivos grupos não estressados por calor.

Figura 17 - Heatmap com as concentrações médias dos neurotransmissores no tronco encefálico

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: o heatmap foi colorido segundo escala de cores. Os dados foram normalizados em relação a média do grupo controle (C), seguido por normalização para cada neurotransmissor. Os agrupamentos de linhas e colunas foi feito para identificar semelhanças entre os neurotransmissores e foi baseado na distância euclidiana e método de aglomeração completa. As distâncias são representadas pelos dendogramas nos eixos x e y do gráfico. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

8.4 DISCUSSÃO

O modelo de co-infecção por *Eimeria* spp. e *C. perfringens* foi usado neste estudo numa tentativa de se reproduzir a realidade observada no campo (AL-SHEIKHLY; AL-SAIEG, 1980); de fato, a coccidiose tem sido considerada a

ocorrência mais comum observada no curso clínico da enterite necrótica (NE) (PARISH, 1961; LEE et al., 2011). De acordo com Parish (1961a), a combinação de *Eimeria* spp. com *C. perfringens* induz necrose intestinal com recrutamento massivo de heterófilos para o sítio da infecção. Esta lesão por sua vez, tem potencial para liberar citocinas do local inflamado para a circulação ativando o SNC e modulando o comportamento animal, conforme já sugerido em outros contextos experimentais (DUNN, 2006; POON et al., 2013). O presente modelo experimental buscou, assim, simular as complexas interações existentes entre os processos infecciosos intestinais, para analisar os dados neuroquímicos provenientes de aves de corte na presença ou ausência de estresse por calor.

Estudos anteriores comprovaram que a infecção intestinal por *C. perfringens* *per se* aumentou a produção de citocinas no intestino e modulou as populações de leucócitos no baço e na circulação sistêmica (ver capítulos 8 e 9). Sendo assim, é factível supor que as citocinas liberadas no intestino das aves tenham adentrado o SNC das mesmas, ativando o eixo HPA que, por sua vez, teria modulado o comportamento dos animais, como já sugerido anteriormente (JOHNSON et al., 1993; TURNBULL; RIVIER, 1995; CALEFI et al., 2016). Além disso, é também possível sugerir que a sensibilização das terminações nervosas aferentes viscerais pelas citocinas intestinais possa ter ativado indiretamente o SNC e, por consequência o eixo HPA (FUKUDO, 2007). Neste sentido, quer nos parecer seja possível afirmar que a associação dos efeitos das citocinas liberadas no intestino das aves infectadas com aqueles produzidos pelo estresse por calor tenha resultado tanto em uma ativação direta como indireta do SNC influenciando o comportamento e a atividade imune dos frangos, via modulação do eixo cérebro-intestino (CALEFI et al., 2016b).

Em mamíferos, a ativação do eixo HPA pela injeção de LPS induz resposta neuroquímica, caracterizada por aumento dos níveis de NOR, DA e de 5-HT (BREBNER et al., 2000; DUNN, 2006). A IL-1 por sua vez aumenta principalmente NOR e a 5-HT; o TNF- α , por sua vez, somente induz aumento de NOR e 5-HT quando presente em altas concentrações (KABIERSCHE et al., 1988; ZALCMAN et al., 1994). De fato, nosso estudo demonstrou que a infecção por *C. perfringens* (grupo Cp) aumentou os níveis de DA no córtex pré-frontal, hipotálamo e mesencéfalo. A co-infecção por *C. perfringens* e *Eimeria* spp. aumentou os níveis de DA somente no córtex pré-frontal e no hipotálamo. Isso nos faz pensar que a

infecção pelo *C. perfringens* esteja relacionada principalmente à ativação de vias dopaminérgicas, uma vez que a infecção por *Eimeria* spp. mostrou uma tendência para redução das concentrações de DA e da relação HVA/DA nas estruturas cerebrais analisadas. A possível explicação para estes achados estaria na liberação de IL-1 pelo processo infeccioso (BREBNER et al., 2000). A infecção por *C. perfringens* e a co-infecção por *C. perfringens* e *Eimeria* spp. foram descritas como capazes de aumentar os níveis de IL-1 no intestino delgado, o que não foi observado pela infecção por *Eimeria* spp. de forma isolada (Capítulos 8 e 9). Desta forma, a IL-1 liberada poderia chegar ao SNC dos animais dos grupos Cp e Cp+Ei, ativando o eixo HPA dos mesmos, com consequente liberação de DA (SULLIVAN; DUFRESNE, 2006).

A gravidade do processo infeccioso também parece estar relacionada com as monoaminas cerebrais analisadas. O aumento de NOR+AD somente foi encontrado nos animais dos grupos Ei+Cp e não foi observado nos animais dos grupos Ei e Cp. Sabe-se que o processo de co-infecção produz maior lesão tecidual que a infecção isolada pelos patógenos (AL-SHEIKHLY; AL-SAIEG, 1980). Desta forma, os animais do grupo Ei+Cp apresentaram, possivelmente, uma maior ativação do eixo HPA em decorrência do maior processo lesivo e inflamatório intestinal, o que teria resultado no aumento das concentrações de NOR+AD no SNC das aves (ZULKIFLI et al., 1997; BORSOI et al., 2015). Além disso, a co-infecção aumentou as concentrações de 5-HT e 5-HIAA no córtex, hipotálamo e tronco encefálico, fato não observado quando das infecções isoladas. No entanto, observamos neste estudo que qualquer um dos tipos de infecção intestinal ativou o sistema serotoninérgico mesencefálico, representado pelo aumento dos níveis de 5-HT e 5-HIAA. Sendo assim, acreditamos que a ativação de vias serotoninérgicas no córtex, hipotálamo e tronco encefálico seja proporcional à magnitude do processo infeccioso e lesivo intestinal; neste contexto, o sistema serotoninérgico do mesencéfalo seria uma região mais sensível ao processo infeccioso intestinal. Não podemos descartar, também, a possibilidade de que a ativação no sistema serotoninérgico mesencefálico module o sistema DA contribuindo para as variações dos níveis de DA e HVA observadas nos animais com processos infecciosos (ARBORELIUS et al., 1993; PALERMO-NETO, 1997).

Nosso estudo mostrou que o estresse por calor e a infecção intestinal ou a co-infecção por *Eimeria* spp. e *C. perfringens* diminuiu as concentrações de

NOR+AD no hipotálamo e no córtex pré-frontal; neste sentido, quanto maior foi a intensidade e a duração do estresse, menor foi a concentração de catecolaminas no córtex pré-frontal e no hipotálamo das aves. Como comentado por Calefi et al. (2016b; Capítulo 5) o processo infeccioso intestinal contínuo associado ao calor induziu um elevado nível de estresse crônico nos frangos de corte. Mostramos, neste sentido, que o estresse por calor produziu efeitos sinérgicos aos das citocinas com relação à ativação de neurônios hipotalâmicos dos frangos de corte.

O presente estudo mostrou que o estresse por calor *per se* reduziu os níveis de NOR+AD e aumentou aqueles de MHPG no córtex pré-frontal, mesencéfalo, hipotálamo e tronco encefálico (sugerindo aumento de atividade catecolaminérgica) e, ao mesmo tempo aumentou o *turnover* de dopamina medido pela relação DOPAC/DA nestas mesmas regiões. Quer nos parecer, assim, que o modelo experimental empregado neste trabalho produziu, de fato, um estresse crônico intenso, observado neste estudo pelo aumento da atividade catecolaminérgica central; como já sugerido para outros estressores aplicados a mamíferos (ADELL et al., 1988). Em especial, estes achados parecem indicar que o sistema dopaminérgico também participe da resposta aos estressores em aves, de forma semelhante àquela encontrada em mamíferos submetidos a estresse agudo ou crônico (DUNN; FILE, 1983; FINLAY et al., 1995; ALVES; PALERMO-NETO, 2007; COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010). Sabe-se, por outro lado, que variações dos níveis e no *turnover* de DA (DOPAC/DA) podem se refletir em alterações na atividade do sistema NOR (ONO, 1992). De fato, a existência de mecanismos de *feedback* entre os sistemas DA e NOR tem sido amplamente notificada na literatura (DE SOUZA; PALERMO-NETO, 1982, 1985; PALERMO-NETO, 1997).

As alterações neuroquímicas que observamos em aves, já foram relacionadas a mudanças de padrões cognitivos em mamíferos; estas mudanças já foram associadas a alterações de atividade neuronal em áreas mesocorticais dos mesmos (ARNSTEN, 1998). Este padrão de alteração neuroquímica observado neste estudo foi, também associado a modificações no comportamento social de aves (CHENG et al., 2003; HARA et al., 2007; LEBLOIS et al., 2010).

A influência dos efeitos do estresse por calor sobre o sistema dopaminérgico é reforçada neste estudo pelo aumento que observamos no *turnover* de DA (HVA/DA) no hipotálamo, no mesencéfalo e no tronco encefálico. Observou-se, também um aumento da relação HVA/DA em áreas do SNC de camundongos após

o uso de LPS (DUNN, 1992). Desta forma, quer nos parecer que o aumento de atividade catecolaminérgica desencadeado pelo calor nos frangos possa estar, de alguma forma, relacionado à queda dos índices zootécnicos que relatamos nestas aves, quiçá, via redução do bem estar animal, da interação social dos animais ou dos comportamentos locomotor e alimentar dos animais. Lembra-se, neste momento que a DA nigroestriatal está diretamente relacionada à atividade locomotora de mamíferos (DE SOUZA; PALERMO-NETO, 1982, 1985; PALERMO-NETO, 1997).

Segundo Sheridan (2003) a liberação de NOR+AD no hipotálamo produziu ativação do eixo HPA, com consequente liberação de corticosterona. A corticosterona modula a migração de heterófilos para o sitio de uma infecção e, desta forma, modula a intensidade desta lesão (CALEFI et al., 2014; Capítulo 6). Neste sentido, Calefi et al. (2016b) mostraram que a infecção por *C. perfringens* tipo A ativou regiões hipotalâmicas relacionadas com o eixo HPA; mostraram, ainda, que a associação entre a infecção e o estresse crônico por calor aumentou a atividade de neurônios hipotalâmicos e desencadeou um possível *feedback* negativo no eixo HPA, culminando este fato com uma redução dos níveis séricos de corticosterona. Tais dados concordam com o perfil de atividade catecolaminérgica cerebral encontrada neste estudo nos animais dos grupos C/HS35, Ei/HS35, Cp/HS35 e Ei+Cp/HS35.

Além de envolver o sistema catecolaminérgico, observamos que o estresse por calor *per se* influenciou o sistema serotoninérgico. De fato, ele reduziu os níveis de 5-HT e aumentou o *turnover* de 5-HT como observado por meio da relação 5-HIAA/5-HT no hipotálamo, mesencéfalo e tronco encefálico das aves. Estes dados sugerem a ocorrência de um aumento de atividade deste sistema nesta área. As alterações encontradas nas concentrações de 5-HT e no *turnover* de 5-HT (5-HIAA/5-HT) concordam com aquelas relatadas no hipotálamo e no tronco encefálico de animais mantidos sob estresse crônico (MORGAN et al., 1975; KENNETT et al., 1985; ADELL et al., 1988). No entanto, há que ressaltar que o estresse por calor não alterou quer os níveis de 5-HT quer a relação 5-HIAA/5-HT no córtex pré-frontal das aves.

A visualização dos achados neuroquímicos comuns entre as diferentes estruturas cerebrais analisadas em animais estressados por calor deixa claro que o hipotálamo, o mesencéfalo e o tronco encefálico apresentam um perfil neuroquímico de mudanças, semelhante. No entanto, como já comentado para a 5-HT, pequenas

diferenças no perfil neuroquímico foram observadas no córtex pré-frontal das aves. Isso se deve, provavelmente ao fato de terem estas estruturas cerebrais atividades nervosas muito distintas. A atividade do córtex pré-frontal tem sido associada a funções cognitivas complexas, enquanto que aquelas do hipotálamo, do tronco encefálico e do mesencéfalo têm sido mais relacionadas às funções motoras, endócrinas e, entre outras, autonômicas, estando, também, envolvidas com a distribuição dos estímulos nervosos para as regiões corticais (KUENZEL, 1972, 1994). Neste sentido, observou-se que lesões efetivadas no hipotálamo, no tronco encefálico e/ou no mesencéfalo de aves produzem uma redução na frequência de ingestão de água e de comida (ROBINZON EKATZ, 1980).

Quer nos parecer que os dados provenientes dos animais estressados de forma crônica apresentem um perfil neuroquímico compatível com a expressão do comportamento doentio, relacionado tanto ao aumento da concentração de 5-HT observada no córtex pré-frontal como, também, à queda de interação social, presença de comportamento do tipo depressivo, ativação do eixo HPA e diminuição da ingestão de alimentos e água (JOHNSON et al., 1993; KELLEY et al., 2003; MILLER, 2003; DANTZER et al., 2008; CALEFI et al., 2016). De fato, Calefi et al. (2016), observaram que uma infecção crônica por *C. perfringens* produziu alterações comportamentais caracterizadas por menor frequência de locomoção e de alimentação, apresentando ao mesmo tempo maior expressão de um comportamento do tipo sonolento.

Por tudo quanto exposto, somos levados a acreditar que quanto mais lesivo for o processo infeccioso instaurado no epitélio intestinal das aves, maior será a ativação observada no SNC, fato confirmado neste estudo tanto pela modulação das monoaminas cerebrais como pela ativação do eixo cérebro-intestinal. Além disso, quer nos parecer que o estresse crônico, e a infecção por *C. perfringens* e e por *Eimeria* spp., tenham atuado de forma sinérgica no que diz respeito à ativação de vias neuronais relacionadas ao estresse; por conseguinte, é de se acreditar que infecções intestinais em aves sejam estressoras *per se*. Acreditamos, finalmente, que os achados deste estudo possam ser relevantes não apenas para o entendimento da fisiopatologia da NE como para o aprofundamento da compreensão das vias neurais ligadas à expressão comportamental em frangos de corte.

9 EFEITOS DO ESTRESSE POR CALOR SOBRE O BALANÇO DE CITOCINAS TH1/TH2, AS ALTERAÇÕES ANATOMOPATOLÓGICAS E A EXPRESSÃO DE RECEPTORES DO TIPO TOLL NO INTESTINO DELGADO DE FRANGOS DE CORTE INFECTADOS POR *Clostridium perfringens* TIPO A COM OU SEM CO-INFECÇÃO POR *Eimeria* spp.

9.1 INTRODUÇÃO

A enterite necrótica (NE) é uma doença reemergente que produz anualmente grandes perdas na avicultura industrial (SHANE, 2005). Em função de sua causa multifatorial diversos modelos experimentais foram propostos como forma de reproduzir a doença tal como acontece a campo (LEE et al., 2011). No entanto, pela dificuldade da reprodução da doença clínica empregando-se apenas a infecção por *C. perfringens*, alguns autores sugerem a associação da infecção com fatores que possam predispor ao desenvolvimento da doença como, por exemplo, adição de caldo tioglicolato (COOPER; SONGER, 2010) e/ou de farinha de peixe à ração fornecida às aves (TRUSCOTT; AL-SHEIKHLY, 1977) ou, ainda, a realização de uma co-infecção com outros patógenos, sendo a *Eimeria* spp. aquele utilizado com maior frequência nestes casos (MCREYNOLDS et al., 2004).

Devido à complexidade da etiopatogenia da NE, algumas hipóteses ligadas a causas ambientais também têm sido apontadas como predisponentes ao desenvolvimento da NE; destas, destaca-se a presença do estresse (CALEFI et al., 2014). O estresse é conhecido como sendo capaz de reduzir o consumo de ração (QUINTEIRO-FILHO et al., 2012a), de induzir lesão intestinal (BURKHOLDER et al., 2008; LAMBERT, 2009) e de influenciar a resposta imune (HONDA et al., 2015); além disso, o tipo, a intensidade e a duração do estressor aplicado às aves podem levar a respostas distintas que vão desde um incremento da resposta imune (STAR et al., 2007), até mesmo a uma redução desta mesma resposta frente a desafios antigênicos (ZULKIFLI et al., 2000).

O conhecimento da dinâmica do sistema imune durante os desafios infecciosos e as situações de estresse pode contribuir para a compreensão dos mecanismos pelos quais a NE se desenvolve. Tal fato é importante pois permite

direcionar a aplicação de medidas racionais e, portanto, mais apropriadas para o controle do desenvolvimento da NE.

Calefi et al. (2014) mostraram que o estresse por calor reduziu a lesão e a inflamação intestinal quando de uma infecção por *C. perfringens*, bem como diminuiu a adesão bacteriana ao epitélio intestinal. Por sua vez, Calefi et al. (2016) trabalhando com um modelo experimental de NE confirmaram a existência de uma redução da inflamação heterofílica e da lesão intestinal em frangos de corte estressados por calor; estes autores sugeriram, nestes trabalhos, que o meio fluído tioglicolato (MFT) e/ou a infecção por *C. perfringens* modularam o eixo cérebro-intestinal das aves. Neste contexto, Tsiouris et al. (2015a,b), mostraram, em modelo experimental de NE que empregou co-infecção por *Eimeria* spp., que o estresse por frio ou por alta densidade populacional são fatores predisponentes ao desenvolvimento da mesma.

Sabe-se que as citocinas liberadas no intestino são responsáveis por debelar os processos infecciosos por *Eimeria* spp. (MIN et al., 2001). Segundo estes autores, a adição de algumas citocinas (IL-8, linfotactina, IFN- γ , IL-15, TGF- β 4, IL-1 β) durante o processo de vacinação contra *Eimeria* spp. modifica e até mesmo impede a patogênese da coccidiose. Desta forma, fica evidente que o conhecimento do papel desempenhado pelas citocinas durante uma infecção por *C. perfringens* pode de alguma forma, propiciar ferramentas para um controle mais efetivo da NE. Embora existam alguns trabalhos que estudem os efeitos de estressores sobre modelos de NE, são raros ou ausentes na literatura estudos que analisem as modulações exercidas pelas citocinas na NE quando da presença de estresse.

Devido à carência destas informações e de outras relacionadas à neuroimunomodulação em frangos de corte infectados e/ou co-infectados por *C. perfringens* e *Eimeria* spp. buscou-se analisar, neste estudo, a expressão de citocinas e de receptores do tipo toll (TLRs) no intestino delgado e tonsila cecal de frangos de corte, durante o curso de uma NE; analisaram-se, também, os níveis de corticosterona sérica, os escores de lesão macro e microscópicos intestinais.

9.2 MATERIAIS E MÉTODOS

9.2.1 Animais

Frangos de corte com um dia de vida foram alojadas em salas climatizadas nas dependências da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil. Um total de 56 frangos de corte machos (Cobb 500[®]) foram mantidas em câmaras isoladoras (Alesco, São Paulo, Brasil), contendo filtros de ar com alta eficiência na separação de partículas (HEPA), desde o primeiro (ED1) até o último dia experimental (ED23). As aves receberam água e ração *ad libitum*. A umidade relativa do ar foi monitorada e controlada (em não menos que 45%). Os animais foram mantidos e utilizados de acordo com as orientações e aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil (nº 3071/2013).

9.2.2 Formação de grupos

No dia experimental 1 (ED1), os frangos foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos de sete animais cada, sendo eles: grupo controle (C); grupo de animais infectados por *Eimeria* spp. (Ei); grupo de animais infectados com *C. perfringens* (Cp); grupo de animais co-infectados com *C. perfringens* e *Eimeria* spp. (Cp+Ei); grupo controle estressado por calor (C/HS34); grupo de animais infectados por *Eimeria* spp. e estressados por calor (Ei/HS34); grupo de animais infectados com *C. perfringens* e estressados por calor (Cp/HS34); grupo de animais co-infectados com *C. perfringens* e *Eimeria* spp. e estressados por calor (Cp+Ei/HS35).

9.2.3 Protocolo de estresse por calor

Os frangos dos grupos estressados por calor (C/HS34, Ei/HS34, Cp/HS34, Cp+Ei/HS35) foram mantidos à temperatura ambiente de $34 \pm 1^\circ\text{C}$ do ED17 ao ED23. O estresse por calor foi realizado com ciclo de 12 h por dia, sendo 12 h de conforto térmico e 12 h de estresse por calor. Durante este período, as aves não estressadas por calor (C, Cp, Ei, Cp+Ei) foram mantidas a uma temperatura ambiente de $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

9.2.4 Protocolo de infecção por *Eimeria* spp.

No ED18 os animais dos grupos Ei, Cp+Ei, Ei/HS35, Cp+Ei/HS35 receberam a vacina BioCoccivet-R (Biovet, SP, Brasil), por gavagem, em uma concentração de 30 vezes maior que aquela recomendada pelo fabricante. A vacina usada contém oocistos vivos de cepas precoces de *Eimeria acervulina*, *E. brunetti*, *E. hagani*, *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. mivati*, *E. maxima* e *E. praecox*.

9.2.5 Preparo do inoculo e protocolo de infecção por *C. perfringens*

O presente protocolo foi adaptado de Calefi et al. (2014). Foi utilizada uma cepa patogênica de *C. perfringens* tipo A com o genótipo para produção das toxinas Tpel e α . Esta cepa bacteriana vem sendo mantida em glicerol a -80°C até o início do cultivo. O inóculo foi produzido por meio de dois cultivos alternativos em meio de carne cozida (CMM, Becton, Dickinson and Company) e meio de infusão cérebro coração (BHI, Becton, Dickinson and Company, MD, EUA) com 2% de extrato de levedura (Becton, Dickinson and Company). As bactérias (1×10^8 ufc/mL). O inóculo assim preparado foi oferecido aos frangos em comedouros de alumínio do ED19 ao ED22; empregou-se uma concentração final de aproximadamente 1×10^4 ufc/mL. Do ED1 a ED23, os animais receberam ração orgânica formulada para

frangos de corte com 24% de proteína bruta. A partir do ED19 os animais dos grupos (Cp, Cp+Ei, Cp/HS35, Cp+Ei/HS35) receberam o meio de cultura contendo a cepa patogênica de *C. perfringens* tipo A misturados na ração na proporção 1:1 (v/v). Os restos de ração foram descartados previamente ao fornecimento do novo inóculo. As aves do grupo controle (C e C/HS35) foram alimentadas apenas com ração comercial. Depreende-se, pois, que a infecção foi realizada pela ingestão voluntária de alimento contendo o meio de cultura BHI com o *C. perfringens*.

9.2.6 Quantificação de corticosterona livre e total

Amostras de sangue foram coletadas das veias braquial dos animais de todos os grupos no ED23; os soros foram obtidos para a quantificação hormonal. Os níveis de corticosterona foram quantificados por intermédio de kits de ELISA comercial (Ensaio Arbor, Michigan, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, precedidos por diluições padronizadas. A concentração de corticosterona livre foi determinada pela concentração de corticosterona que não estava ligada às proteínas plasmáticas; a corticosterona total foi determinada após dissociação da corticosterona das proteínas plasmáticas. A corticosterona foi quantificada por interpolação gráfica em uma curva padrão, sendo expressa em picogramas por mililitro de corticosterona plasmática (pg/mL); os resultados foram multiplicados pelo fator de diluição utilizado no teste.

9.2.7 Quantificação de *C. perfringens* em conteúdo cecal

No ED 23, o conteúdo do ceco esquedo de cada animal foi diluído 1:2 em água peptonada 2% (Becton, Dickinson and Company), seguindo-se de diluição seriada na base 10; os conteúdos foram semeados em placas contendo meio BHI com 0,5% de extrato de levedura e 5% de sangue citratado bovino. O material foi incubado em condições anaeróbicas a 37° C por 48 horas. Após a incubação,

contou-se o número de ufc tomando-se por base as características das colônias e o tipo de hemólise no meio de cultura.

9.2.8 Avaliação macroscópica intestinal

Após a eutanásia dos animais (ED 23) os intestinos foram incisados para a avaliação macroscópica de toda extensão do intestino. Avaliou-se o aspecto macroscópico intestinal dos animais infectados por *C. perfringens* bem como daqueles do grupo controle (grupos C, C/HS35, Cp, Cp/HS35, Ei+Cp, Ei+Cp/HS35) empregando-se o sistema de escores de lesão descrito por Calefi et al., 2014. Para os animais dos grupos Ei e Ei/HS35 empregou-se o sistema de escores de lesão de 0 a +4 proposto por Johnson e Reid (1970) para *E. acervulina*, *E. máxima* e *E. brunetti* no duodeno, jejuno e íleo.

9.2.9 Avaliação microscópica intestinal

Secções com 2,5 cm de comprimento da flexura duodenal inferior, jejuno (a região intermediária entre a extremidade do duodeno e divertículo de Meckel), íleo (a região média entre divertículo de Meckel e junção ileocecal), proventrículo e moela foram colhidas no ED 23 para exame histopatológico. Estas regiões foram coletadas de todos os animais, independentemente da presença de alterações histopatológicas. Os tecidos foram fixados em formol a 10% durante 48 horas; subsequentemente, os materiais foram embebidos em parafina seguindo-se procedimento padrão de nossos laboratórios para a inclusão de tecidos. Cortes transversais de 5 µm foram corados com HE. O exame histopatológico foi realizado por meio de microscopia óptica sob os aumentos de 40x, 200x e 400x.

Para o diagnóstico das lesões e comparação dos achados entre grupos toda a área de três secções intestinais transversais por porção intestinal (duodeno, jejuno e íleo) foi avaliada para a presença de necrose, inflamação (infiltrado de células polimorfonucleares no vilo e cripta e infiltrado mononuclear), fusão das vilosidades,

edema, abscessos de cripta e lesão transmural. Cada tipo de lesão foi classificado como sendo leve (escore 1), moderada (escore 2) e marcante a grave (escore 3) para necrose e inflamação. A fusão das vilosidades foi pontuada como (1): inferior a 3 fusões por secção histológica; (2): entre 3 a 6 vilosidades fusionadas por secção histológica; e (3): mais de 6 vilosidades fusionadas por secção histológica. A ocorrência de abscessos de cripta e lesão transmural foi contabilizada como presente (escore 1) ou ausente (escore 0). A pontuação total por animal foi realizada pela soma dos escores de lesões observadas.

9.2.10 Extração de RNA total e síntese de cDNA

O RNA total das amostras do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e da tonsila cecal esquerda dos animais foi extraído com auxílio do reagente Trizol (Invitrogen Canada Inc. Burlington, Ont., Canada) conforme descrito por Abdul Careem et al. (2006). Em seguida, o RNA total foi processado para síntese do cDNA, utilizando-se um kit comercial paratranscrição reversa conforme instruções do fabricante (iScript, Bio-rad, USA).

9.2.11 Quantificação das citocinas através de PCR em tempo real

Empregou-se PCR em tempo real para quantificar a expressão relativa das citocinas nas amostras processadas de cDNA (1:10 em água tratada com DEPC). A sequência dos genes e *primers* utilizados está descrita na Quadro 5. As reações de PCR foram preparadas em um volume total de 20 µl, utilizando-se como marcador o SYBR Green Select (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). As reações foram processadas no equipamento StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). De forma breve, as condições de amplificação empregadas consistiram de pré-incubação por 10 min a 94° C, seguido de 60 ciclos de 95°C por 10 s; 54° a 64°C para anelamento por 5 s e aquisição e alongação a 72°C por 10 s. A análise da curva de *melting* foi realizada em três etapas: 95°C por 10 s, resfriamento até 55° C por 1 min e aquecimento a 97° C. A média geométrica de

dois genes controle endógenos (genes da β -actina e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase [GAPDH]) foi utilizada para analisar a expressão relativa do gene. Utilizou-se um ciclo limiar relativo (C_T) para determinar a expressão do gene alvo em relação ao controle sem tecido (calibrador). Para cada amostra, a média do C_T do gene alvo foi normalizada utilizando-se a fórmula $\Delta C_T = C_{T \text{ gene alvo}} - C_{T \text{ média GAPDH e } \beta\text{-actina}}$. Para determinar os níveis de expressão relativa, a seguinte fórmula foi usada: $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{amostra})} - \Delta C_{T(\text{calibrador})}$; esse valor foi empregado para o cálculo da expressão relativa utilizando-se a expressão $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Os dados foram centralizados em relação ao grupo C.

Quadro 5 - Sequências de primers utilizados para avaliação da expressão de citocinas e quimiocinas

Gene alvo	Senso	Antisenso	Número de Acesso
GAPDH	5'-GGTGGTGCTAAGCGTGTAT-3'	5'-ACCTCTGTCATCTCTCCACA	K01458
β -actina	5'-CAACACAGTGCTGTCTGGTGG-3'	5'-ATCGTACTCCTGCTTGCTGAT-3'	X00162
IFN- α	5'-GACATCCTTCAGCATCTCTTCA-3'	5'-AGGCGCTGTAATCGTTGTCT-3'	AB021154
IFN- γ	5'-AGCTGACGGTGGACCTATTATT-3'	5'-GGCTTTGCGCTGGATTCT-3'	Y07922
IL-1 β	5'-TGGGCATCAAGGGCTACA-3'	5'-TCGGGTTGGTTGGTGATG-3'	Y15006
IL-2	5'-TCTGGGACCACTGTATGCTCT-3'	5'-ACACCAGTGGGAAACAGTATCA-3'	AF000631
IL-6	5'-CAAGGTGACGGAGGAGGAC-3'	5'-TGGCGAGGAGGGATTTCT-3'	AJ309540
IL-10	5'-CGGGAGCTGAGGGTGAA-3'	5'-GTGAAGAAGCGGTGACAGC-3'	AJ621614
IL-12	5'-AGACTCCAATGGGCAAATGA-3'	5'-CTCTTCGGCAAATGGACAGT-3'	NM_213571
IL-13	5'-CCAGGGCATCCAGAAGC-3'	5'-CAGTGCCGGCAAGAAGTT-3'	AJ621735
IL-16	5'-TCCCTCTGCAAAATGGTCA-3'	5'-TCGCGATCTCAGGTTGTGT-3'	AJ508678
IL-17	5'-CTCCGATCCCTTATTCTCCTC-3'	5'-AAGCGGTTGTGGTCCTCAT-3'	AJ493595
LITAF	5'-TGTGTATGTGCAGCAACCCGTAGT-3'	5'-GGCATTGCAATTTGGACAGAAGT-3'	AY765397
TGF- β 4	5'-CGGGACGGATGAGAAGAAC-3'	5'-CGGCCACGATAGTAAATGAT-3'	M31160
TNFSF15	5'-CCTGAGTATTCCAGCAACGCA-3'	5'-ATCCACCAGCTTGATGTCTACTAAC-3'	NM_01024578
LITAF	5'-TGTGTATGTGCAGCAACCCGTAGT-3'	5'-GGCATTGCAATTTGGACAGAAGT-3'	AY765397
MIP1-b	5'-GTGCCCTCATGCTGGTGT-3'	5'-GGTTGGATGCGGATTATTTCT-3'	L34553
MIP3-a	5'-CTCGGAAGGTCATTAAGG-3'	5'-CTTAGGATTTACGCAGGC-3'	NM_204438
MyD88	5'-TCCCGGCGGTAGACAGC-3'	5'-ACGACCACCATCCTCCGACACCTT-3'	NM_001030962
T-bet	5'-GGGAACCGCCTCTACCTG-3'	5'-AGTGATGTGCGCGTTCTGG-3'	CB016768
TLR2	5'-ATCCTGCTGGAGCCCATTCAGAG-3'	5'-TTGCTCTTCATCAGGAGGCCACTC-3'	XM_010710072
TLR4	5'-TGCCATCCCAACCCAACCACAG-3'	5'-ACACCCACTGAGCAGCACCAA-3'	AY064697.1

Fonte: (CALEFI, 2016)

9.2.12 Análise estatística

As quantificações de corticosterona e as ufc de *C. perfringens* foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas (Tukey HSD). Os resultados dos escores macro e microscópicos de lesão intestinal foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido do teste *post hoc* de comparações múltiplas para comparações entre os grupos utilizando-se a função *kruskalmc* do pacote *pgirmess* empregando-se o software estatístico R versão 3.2.3. Foram consideradas significantes as análises com $P \leq 0,05$.

Para a realização dos *heatmaps* foi utilizada a função *heatmap.2* do pacote *gplots* (versão 2.12.1) empregando-se o software estatístico R versão 3.2.3. Para a visualização das correlações entre as citocinas, usou-se a técnica proposta por Hurley (2004) para visualização de dados multidimensionais. Para cada correlação entre as citocinas foi determinado um escore para os ranques dos valores de correlação absolutos. Com a permutação das variáveis e por proximidade entre os méritos, os gráficos foram rearranjados próximos ao eixo diagonal e agrupados quanto maior o nível de correlação. Os méritos atribuídos foram coloridos como: vermelho para o terço superior de mérito ($>0,7$; alta correlação), azul para o terço médio de mérito (0,3 a 0,7) e amarelo para o terço inferior de mérito ($<0,3$). Foi descrito como padrão de transição as matrizes de correlação que apresentaram dispersão de gráficos vermelhos ao longo do eixo diagonal sem formar agrupamentos definidos. Desta forma, foi possível visualizar se as correlações foram positivas ou negativas seguindo-se o sentido da dispersão dos pontos em cada gráfico. As análises estatísticas e os gráficos foram gerados empregando-se o pacote *gclus* no software estatístico R versão 3.2.3.

9.3 RESULTADOS

9.3.1 Quantificação dos níveis de corticosterona sérica livre e total

Os animais dos grupos C/HS35 apresentaram uma tendência para níveis

maiores de corticosterona sérica livre e total quando comparados aos animais do grupo T (Figura 18). Embora mais discreta, esta tendência também foi observada nos animais do grupo Cp/HS35 em relação aos animais do grupo Cp (Figura 18). Os animais que foram infectados com *Eimeria* (grupo Ei), e aqueles co-infectados com *Eimeria* e *C. perfringens* (grupo Ei+Cp), quando submetidos ao estresse por calor, apresentaram menores concentrações de corticosterona livre e total quando comparados aos respectivos grupos não estressados (Figura 18). Os animais do grupo Ei/HS35 apresentaram concentrações significativamente menores de corticosterona livre quando comparados aos animais do grupo Ei (Figura 18).

Figura 18 - Níveis séricos de corticosterona livre e total nos frangos de corte

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: Barras representam a concentração sérica média de corticosterona $\pm$ desvio padrão por grupo. Letras diferentes sobre as barras representam diferenças estatisticamente significantes em $P < 0.05$ (teste de Tukey HSD). Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

9.3.2 Contagem de ufc de *Clostridium perfringens* no conteúdo cecal

O estresse por calor aumentou o número de ufc medido no conteúdo cecal dos animais do grupo Cp/HS35 e Ei+Cp/HS35 em relação aos animais do grupo Cp ($P < 0,05$; Figura 19). As aves do grupo Ei+Cp apresentaram contagens de ufc intermediárias às mensuradas nos animais dos grupos Cp e Ei+Cp/HS35 ($P > 0,05$;

Figura 14).

Figura 19 - Efeitos do estresse por calor na contagem de *Clostridium perfringens* no ceco dos frangos de corte

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: Valores representam a média $\pm$ desvio padrão de ufc/g de conteúdo cecal. As diferentes letras sobre as barras indicam diferenças significantes com $P < 0,05$ (teste de TukeyHSD). Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

9.3.3 Avaliação macroscópica intestinal

Os animais do grupo C não apresentaram lesão macroscópica no duodeno, jejuno e íleo (Figura 20). Já os animais do grupo C/HS35 apresentaram alterações macroscópicas com mediana de escores de lesão igual a +1. Quando da co-infecção por *Eimeria* e *C. perfringens* as aves do grupo Ei+Cp apresentaram mediana de escores +2, no duodeno e jejuno, sendo este valor estatisticamente maior que aquele do grupo C. Entretanto, o grupo Ei+Cp/HS35 apresentou redução nos escores macroscópicos em comparação ao grupo Ei+Cp (Figura 20). De forma semelhante, as aves do grupo Ei/HS35 apresentaram redução nos escores macroscópicos de lesão no jejuno comparado com aquelas do grupo Ei. Além do

mais, os animais do grupo Cp/HS35 apresentaram maiores escores de lesão macroscópica quando comparados ao grupo Cp (Figura 20).

Figura 20 - Escores de lesão macroscópico no duodeno, jejuno dos frangos de corte

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: boxplots representam a mediana com valores máximos e mínimos de escores por grupo. * representam diferenças estatisticamente em relação ao grupo C (teste de Kruskal-Wallis). Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

9.3.4 Avaliação microscópica intestinal

Os escores microscópicos avaliados nas aves dos diferentes grupos foram ilustrados na Figura 21; sua leitura confirma e reforça o observado quando da avaliação macroscópica. O grupo Ei+Cp apresentou mediana de escores de lesão estatisticamente maior que o grupo C, enquanto que o grupo Ei+Cp apresentou redução nos escores de lesão. Por sua vez os animais do grupo Ei apresentaram aumento significativo nos escores de lesão quando comparados aos do grupo C; as aves do grupo Ei/HS35 apresentaram redução dos escores de lesão em relação às do grupo C. Reforçando o que foi exposto na Figura 21, o grupo Cp/HS35 apresentou menor mediana de escore de lesão microscópica que o grupo Cp quer no duodeno como no jejuno e no íleo (Figura 21).

Figura 21 - Escores de lesão microscópicas no duodeno, jejuno dos frangos de corte

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: boxplots representam a mediana com valores máximos e mínimos de escores por grupo. * representam diferenças estatisticamente em relação ao grupo C (teste de Kruskal-Wallis). Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

9.3.5 Expressão relativa das citocinas e T-bet no intestino delgado de frangos de corte

Para facilitar a exposição dos resultados obtidos quanto à expressão relativa de citocinas, os resultados foram apresentados em separado para duodeno, jejuno, íleo e tonsila cecal; isto foi feito para a representação das citocinas IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-17, LITAF, MIP1, MIP3, IFN- α , IFN- γ , TNF, TGF- β . Posteriormente, os resultados foram divididos em subtópicos para a representação da expressão de MyD88, TLR2, TLR4. Os valores brutos da expressão relativa das citocinas esplênicas foram apresentados no Apêndice B.

9.3.5.1 Duodeno

A Figura 22 mostra o comportamento das citocinas frente aos desafios empregados neste estudo. Observa-se que os animais do grupo Ei+Cp apresentaram aumento da expressão de citocinas frente ao desafio infeccioso, com exceção de IL-2 e IL-6. Por sua vez, notam-se variações discretas na expressão de citocinas nas aves dos grupos Ei e Cp, o que as posiciona na figura em proximidade com aquelas do grupo C. Além disso, nos grupos estressados por calor observa-se uma tendência de agrupamento no quadrante superior do gráfico, compondo um agrupamento representado pelo dendrograma no eixo y; este padrão de distribuição indica um aumento generalizado de citocinas quando comparado ao apresentado pelos animais não estressados pelo calor.

Conforme mostrado pelo dendrograma no eixo x da Figura 23 e, corroborando com dados obtidos pela análise de regressão multivariada, as citocinas IL-6, IL-17, MIP3 e MIP1 apresentam baixa correlação com as demais citocinas; desta forma, elas foram retiradas do painel representado na Figura 23. Este painel ilustra as matrizes de classificação de correlações absolutas para as variações de citocinas agrupadas por similaridade para cada um dos grupos experimentais. Os principais agrupamentos que mostraram presença de altas correlações entre as citocinas foram resumidos na Quadro 6.

Figura 22 - Heatmap com as expressões de citocinas relativas no duodeno dos frangos

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: o heatmap foi colorido segundo escala de cores. Os dados foram normalizados em relação a média do grupo controle (C), seguido por normalização para cada fenótipo. Os agrupamentos de linhas e colunas foi feito para identificar semelhanças entre os fenótipos e foi baseado na distância euclidiana e método de aglomeração completa. As distâncias são representadas pelos dendogramas nos eixos x e y do gráfico. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

Figura 23 - Painel com matriz de gráficos de dispersão para a expressão relativa de citocinas no duodeno por grupo

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: Variáveis são reordenadas utilizando algoritmo OSL1 na matriz de classificação de correlações absolutas. Os painéis de cores mostram o nível de classificação de correlação absoluta: rosa = terço superior, azul = terço médio, amarela = terço inferior. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

Quadro 6 - Grupos de citocinas com altas correlações positivas entre si no duodeno

Grupo	Agrupamento
C	Padrão de transição
C/HS35	Padrão de transição
Ei	LITAF, IFN- γ , IL-12, IL-16
Ei/HS35	IL-1, TNFSF15, LITAF, IL-10, IL-12, IL-13, IFN- γ
Cp	IFN- α , IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-12
Cp/HS35	IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-13, TNFSF15
Ei+Cp	IL-2, IL-10, IL-13, IFN- α , TGF- β 4
Ei+Cp/HS35	IFN- α , IFN- γ , LITAF, IL-2, IL-10, IL-12, IL-13, TNFSF15

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: Informação resumida da matriz de correlação Figura 19. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

9.3.5.1 Jejuno

A Figura 24 ilustra o fato de que os grupos C e Cp apresentaram poucas variações entre si no tocante às expressões de citocinas; isto pode ser visualizado pelo dendrograma no eixo y. Com exceção deste padrão, a análise do heatmap parece não evidenciar padrões evidentes nas expressões de citocinas. No entanto, quer nos parecer seja possível sugerir que o estresse por calor tenha produzido uma aumento ou, pelo menos, uma tendência de aumento, a na expressão de citocinas, fato exemplificado pelo aumento das citocinas do grupo Ei+Cp/HS35 em relação ao grupo Ei+Cp.

A análise de regressão multivariada, por sua vez mostra alguns agrupamentos de citocinas com alta correlação entre si, nas aves dos diferentes grupos experimentais (Figura 25 e Quadro 7).

Figura 24 - Heatmap com as expressões de citocinas relativas no jejuno dos frangos

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: o heatmap foi colorido Segundo escala de cores. Os dados foram normalizados em relação a média do grupo controle (C), seguido por normalização para cada fenótipo. Os agrupamentos de linhas e colunas foi feito para identificar semelhanças entre os fenótipos e foi baseado na distância euclidiana e método de aglomeração completa. As distâncias são representadas pelos dendogramas nos eixos x e y do gráfico. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

Figura 25 - Painel com matriz de gráficos de dispersão para a expressão relativa de citocinas no jejuno por grupo

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: Variáveis são reordenadas utilizando algoritmo OSL1 na matriz de classificação de correlações absolutas. Os painéis de cores mostram o nível de classificação de correlação absoluta: rosa = terço superior, azul = terço médio, amarela = terço inferior. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

Quadro 7 - Grupos de citocinas com altas correlações positivas entre si no jejuno

Grupo	Agrupamento
C	Padrão de transição
C/HS35	IFN- α , IL-2, IL-10, TGF- β 4 / IFN- γ , IL-4, IL-13, TNFSF15
Ei	IFN- α , IL-2, IL-4, IL-10, LITAF, TGF- β 4
Ei/HS35	IFN- α , IFN- γ , IL-2, IL-10, TGF- β 4 / IFN- α , IL-1, IL-4, TNFSF15
Cp	IL-2, IL-10, IL-16, LITAF, TGF- β 4
Cp/HS35	Padrão de transição
Ei+Cp	IFN- α , IFN- γ , IL-4, IL-13, IL-16, LITAF, TGF- β 4, TNFSF15
Ei+Cp/HS35	IFN- α , IL-13, IL-16, LITAF, TGF- β 4

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: Informação resumida da matriz de correlação Figura 21. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

9.3.5.1 Íleo

A leitura da Figura 26 permite destacar os dados do grupo Ei+Cp/HS35 pelos altos níveis de expressão nas citocinas e pela maior distância deste em relação aos demais grupo, excetuando-se os níveis de MIP1. Além disso, observamos uma proximidade entre os dados provenientes dos grupos C, Cp e Ei que mostraram expressão semelhante de citocinas.

A análise de regressão multivariada evidenciou padrões de correlação de citocinas nos diferentes grupos experimentais (Figura 27 e Quadro 8).

Figura 26 - Heatmap com as expressões de citocinas relativas no íleo dos frangos

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: o heatmap foi colorido segundo escala de cores. Os dados foram normalizados em relação a média do grupo controle (C), seguido por normalização para cada fenótipo. Os agrupamentos de linhas e colunas foi feito para identificar semelhanças entre os fenótipos e foi baseado na distância euclidiana e método de aglomeração completa. As distâncias são representadas pelos dendogramas nos eixos x e y do gráfico. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

Figura 27 - Painel com matriz de gráficos de dispersão para a expressão relativa de citocinas no íleo por grupo

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: Variáveis são reordenadas utilizando algoritmo OSL1 na matriz de classificação de correlações absolutas. Os painéis de cores mostram o nível de classificação de correlação absoluta: rosa = terço superior, azul = terço médio, amarela = terço inferior. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp. (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

Quadro 8 - Grupos de citocinas com altas correlações positivas entre si no íleo

Grupo	Agrupamento
C	Padrão de transição
C/HS35	IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IFN- α
Ei	Padrão de transição
Ei/HS35	IFN- α , IL-2, IL-10, IL-12, TGF- β 4, LITAF
Cp	Padrão de transição
Cp/HS35	IFN- α , TGF- β 4, IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, LITAF
Ei+Cp	IFN- α , IFN- γ , IL-10, IL-13, IL-16, TGF- β 4, TNFSF15
Ei+Cp/HS35	IFN- α , IL-1, IL-10, IL-12, IL-16, LITAF

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: Informação resumida da matriz de correlação Figura 23. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

9.3.5.1 Tonsila cecal

Ao observar o heatmap relativo às expressões de citocinas na tonsila cecal, nota-se que estas não se agrupam de modo a apresentar um padrão (Figura 28). Entretanto, tal quadro se altera quando da análise de regressão multivariada; esta análise mostra presença de diferenças significantes nas correlações entre as citocinas (Figura 29 e Quadro 9).

Figura 28 - Heatmap com as expressões de citocinas relativas na tonsila cecal dos frangos

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: o heatmap foi colorido segundo escala de cores. Os dados foram normalizados em relação a média do grupo controle (C), seguido por normalização para cada fenótipo. Os agrupamentos de linhas e colunas foi feito para identificar semelhanças entre os fenótipos e foi baseado na distância euclidiana e método de aglomeração completa. As distâncias são representadas pelos dendogramas nos eixos x e y do gráfico. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

Figura 29 - Painel com matriz de gráficos de dispersão para a expressão relativa de citocinas na tonsila cecal por grupo

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: Variáveis são reordenadas utilizando algoritmo OSL1 na matriz de classificação de correlações absolutas. Os painéis de cores mostram o nível de classificação de correlação absoluta: rosa = terço superior, azul = terço médio, amarela = terço inferior. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

Quadro 9 - Grupos de citocinas com altas correlações positivas entre si na tonsila cecal

Grupo	Agrupamento
C	Padrão de transição
C/HS35	IL-2, IL-10, IL-12 / IL-13, IL-16, TNFSF15, IFN- α
Ei	IFN- α , IFN- γ , IL-4, TNFSF15
Ei/HS35	IL-4, IL-12, IL-13, TGF- β 4 / IL-1, IL-16, TNFSF15,
Cp	IFN- α , IL-4, IL-13, IL-16, TGF- β 4
Cp/HS35	Padrão de transição
Ei+Cp	IL-4, IL-10, LITAF, TNFSF15
Ei+Cp/HS35	IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12, TNFSF15

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: Informação resumida da matriz de correlação Figura 25. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

9.3.5.1 Expressão relativa de T-bet nas porções intestinais

A Figura 30 ilustra a expressão relativa de T-bet nas diferentes porções intestinais dos frangos dos diferentes grupos experimentais. O estresse por calor *per se* modulou a expressão de T-bet, tendo-se observado aumento significativo da expressão relativa de T-bet no duodeno de animais do grupo C/HS35 em relação aos do grupo C. As aves do grupo Cp+Ei/HS35 apresentaram um aumento significativo de T-bet no jejuno e no íleo quando comparadas às do grupo C. Por sua vez, o grupo Cp/HS35 mostrou uma redução significativa de T-bet no duodeno comparado ao grupo Cp.

Figura 30 - Expressão relativa de T-bet no duodeno, jejuno, íleo e tonsila cecal de frangos de corte

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: Barras representam a expressão relativa média $\pm$ erro padrão por grupo. * representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C. # representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo não estressado de mesmo tratamento. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

9.3.6 Expressão relativa de TLR2, TLR4 e MyD88

O estresse por calor aumentou de forma significativa a expressão de MyD88 e TLR2 e TLR4 no duodeno dos frangos de corte, como pode ser observado na Figura 31. Embora de forma não significativa este padrão de resposta se manteve no jejunum, com exceção do grupo Ei/HS35 que apresentou uma redução na expressão de MyD88, TLR2 e TLR4 (Figura 32). Por conseguinte, as tendências de aumento na expressão de MyD88, TLR2 e TLR4 no íleo foram seguidas nas aves dos grupos infectados ou co-infectados e estressados, mas não naquelas do grupo C/HS35 (Figura 33). A análise dos dados obtidos a partir das tonsilas cecais não evidenciou

diferenças significantes entre os grupos no que diz respeito às expressões de MyD88, TLR2 e TLR4 (Figura 34); quer nos parecer, no entanto, que o grupo Cp/HS35 apresentou aumento marcante de MyD88 em relação ao grupo Cp.

Figura 31 - Expressão relativa de TLR2, TLR4 e MyD88 no duodeno de frangos de corte

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: Barras representam a expressão relativa média $\pm$ erro padrão por grupo. * representa diferença estatisticamente significante em relação ao grupo C. # representa diferença estatisticamente significante em relação ao grupo não estressado de mesmo tratamento. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

Figura 32 - Expressão relativa de TLR2, TLR4 e MyD88 no jejuno de frangos de corte

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: Barras representam a expressão relativa média $\pm$ erro padrão por grupo. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

Figura 33 - Expressão relativa de TLR2, TLR4 e MyD88 no íleo de frangos de corte

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: Barras representam a expressão relativa média $\pm$ erro padrão por grupo. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

Figura 34 - Expressão relativa de TLR2, TLR4 e MyD88 na tonsila cecal de frangos de corte

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: Barras representam a expressão relativa média $\pm$ erro padrão por grupo. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

9.4 DISCUSSÃO

Embora muitos estudos tenham abordado os efeitos do estresse por calor em frangos de corte, poucos deles quantificaram outros marcadores do estresse que não a corticosterona; além do mais, encontraram-se poucos estudos na literatura que tenham abordado a existência de possíveis diferenças entre níveis séricos de corticosterona livre e total em frangos de corte. As aves podem ter em sua circulação sistêmica a corticosterona livre, que é capaz de se ligar aos receptores celulares, ou a corticosterona associada às globulinas de ligação de corticosterona

(GLC)(MALISCH; BREUNER, 2010). Quando a corticosterona está associada a GLC ela não se liga e, portanto, não atua em receptores celulares, como por exemplo, nos receptores para glicocorticoides (BREUNER; ORCHINIK, 2002; MALISCH; BREUNER, 2010). A distinção de corticosterona livre e total tem sido estudada em aves de vida livre; relatou-se variação de concentrações de corticosterona e diferentes afinidades de ligação das GR à corticosterona dependendo em função de variações sazonais e/ou reprodutivas (SILVERIN, 1986; WINGFIELD; SILVERIN, 1986; KLUKOWSKI et al., 1997; CYR; MICHAEL ROMERO, 2007). Além disso, mostrou-se a existência de diferenças entre os comportamentos em resposta ao estresse e os níveis séricos de corticosterona livre e total em aves (COCKREM, 2007).

Ainda que a corticosterona seja um marcador clássico do estresse, os dados deste experimento não evidenciaram diferenças significantes entre os grupos C e C/HS35, muito provavelmente, em decorrência da grande variação entre os dados das aves desses diferentes grupos. Mesmo assim, ao analisar os dados dos animais infectados por *Eimeria* spp., observamos que a infecção atuou *per se* como um estressor, isto é, aumentando os níveis circulantes de corticosterona livre nos animais do grupo Ei quando comparados aos do grupo C. Desta forma, parece-nos evidente que a corticosterona livre tenha influenciado a resposta imune e comportamental das aves, mesmo que os níveis de corticosterona total não tenham apresentado diferenças significantes entre os grupos. Calefi et al. (2014 e 2016a,b) observaram uma redução do processo inflamatório intestinal, mesmo na presença de baixas concentrações de corticosterona; associado a isso, relataram diminuição da lesão intestinal. Desta forma, quer nos parecer que, embora não significantes, as tendências de mudança observadas nas variações dos níveis de corticosterona livre e total deste experimento possam indicar a ocorrência de alterações fisiológicas intestinais, ou mesmo de microbiota entre os animais.

De fato, o estresse por calor aumentou a contagem de ufc's de *C. perfringens* no ceco dos animais estressados (Cp/HS35) em comparação aos não estressados (Cp; Figura 15). Este resultado, concorda com o aumento do número de ufc's de *C. perfringens* encontrado no ceco de aves quando da aplicação de um estresse por frio (TSIOURIS et al., 2015a) e por superpopulação (TSIOURIS et al., 2015b). Juntos, eles sugerem que o estresse por calor tenha aumentado a eliminação de *C. perfringens* pelas fezes das aves infectadas, complicando ou predispondo-as ao

desenvolvimento da NE via aumento da carga de contaminação ambiental. No entanto, nossa condição experimental, reduziu significativamente a possibilidade de reinfecção devido à ingestão da bactéria excretada. De fato, os animais foram mantidos em isoladores e assim mantidos não conseguem acessar as fezes que passam para compartimento abaixo do local onde estão; sendo assim, nosso modelo experimental avaliou principalmente a capacidade que tem a cepa inoculada de infectar e produzir a lesão em aves estressadas por calor.

Quando da análise macroscópica, observamos que a contagem de ufc's no ceco foi proporcional ao escore de lesão no intestino delgado dos animais do grupo Cp e Cp/HS35 (Figura 16). Como estes animais não recebiam quaisquer fatores predisponentes ao desenvolvimento do *C. perfringens* via ração, a redução observada nos escores de lesão macroscópicas nos animais do grupo Cp/HS35, quando comparado aos do grupo Cp, pode ser atribuída à aplicação do estresse por calor. As diferenças foram encontradas principalmente no duodeno e no jejuno, local preferencial de instalação da infecção por *C. perfringens*. Por sua vez, análise dos escores de lesão microscópica (Figura 17) mostra que os animais do grupo Cp/HS35 apresentaram maior mediana de escore lesional quando comparados ao grupo Cp. Estes resultados confirmam e reforçam os achados macroscópicos intestinais.

De destacar-se, no entanto, que os presentes dados contrastam com aqueles por nós relatados anteriormente (CALEFI et al., 2016); mostramos uma redução das lesões intestinais nos animais infectados por *C. perfringens* e estressados por calor. Estas diferenças podem ser decorrência de dois fatores principais, a não utilização do caldo tioglicolato para a infecção do *C. perfringens* e a utilização de estresse por calor intermitente no modelo experimental. O tioglicolato, como agente pró-inflamatório age como um gatilho para a produção da NE; pode ser, assim, que a aplicação do estresse por calor no modelo experimental conduzido com o caldo tioglicolato estivesse reduzindo a resposta intestinal dos animais ao tioglicolato e/ou o processo inflamatório por ele desencadeado. Além disso, é possível que a manutenção do estresse a longo prazo, como instituído por Calefi et al. (2014), manteria a supressão do processo inflamatório heterofílico, enquanto que os animais no presente modelo estariam sujeitos a picos intermitentes de temperatura, isto é a períodos de estresse e outros de conforto térmico, o que possibilitaria a migração de heterofilos para o sítio da infecção; este último fato já foi caracterizado como sendo responsável por potencializar a lesão tecidual (HARMON, 1998).

Enquanto o estresse por calor mostrou-se capaz de aumentar a lesão induzida pela infecção do *C. perfringens*, ele produziu efeito oposto na infecção por *Eimeria* spp. A análise macroscópica que realizamos, evidenciou uma redução nos escores de lesão no jejuno dos animais do grupo Ei/HS35 quando comparados aos do grupo Ei. Esta redução foi também observada e é reforçada pela visualização dos escores microscópicos de lesão; de fato, observamos menores medianas de escores de lesão microscópicos no duodeno, jejuno e íleo das aves do grupo Ei. Banfield et al. (1998) relataram ser o estresse por calor capaz de diminuir a eliminação de oocistos de *Eimeria acervulina* em frangos de corte. Além disso, como demonstrado no capítulo 6 desta tese, o estresse por calor diminui a contagem dos estádios intracelulares da *Eimeria* no epitélio intestinal e aumentou a ocorrência de lesões na cripta intestinal. Sendo assim, pode-se dizer que o estresse por calor em frangos de corte tenha interferido diretamente, reduzindo, a patogenicidade da *Eimeria* spp.

A redução da patogenicidade das cepas de *Eimeria* frente ao estresse por calor explica a redução dos escores de lesões macro e microscópicos avaliados nos animais do grupo Ei+Cp/HS35 quando comparados aos do grupo Ei+Cp. Pode-se sugerir que a redução das lesões do epitélio intestinal pela infecção da *Eimeria* spp tenha diminuído a capacidade lesional do *C. perfringens*; em outras palavras, qualquer redução que se faça nas lesões ao epitélio intestinal que predis põem o organismo ao desenvolvimento do *C. perfringens* interfere diretamente no curso da NE. Dessa forma, parece-nos indissociável a necessidade da introdução criteriosa de grupos controles em experimentos como este, em especial para controlar os fatores predisponentes do *C. perfringens*.

Um dos principais determinantes do estabelecimento e da progressão de qualquer processo infeccioso é a modulação efetivada pelo sistema imune. A infecção de frangos de corte por *Eimeria* spp. desencadeia tanto uma resposta imune adaptativa, quanto humoral (LILLEHOJ; OKAMURA, 2003). Estudos têm demonstrado, após uma infecção inicial por *Eimeria* spp., que as células B intestinais presentes no GALT, começam a produzir anticorpos específicos contra os parasitos, com posterior ativação dos linfócitos na lâmina própria e interepteliais, o que garante a imunidade de mucosa (YUN; LILLEHOJ; LILLEHOJ, 2000; LILLEHOJ; MIN; DALLOUL, 2004). Por sua vez, o *C. perfringens* está relacionado à lesão tecidual pela liberação de toxinas, que produzem necrose tecidual, culminando com a mobilização maciça de heterofilos e linfócitos para o sítio de infecção. Em casos

graves, observa-se necrose de multifocal a difusa dos vilos e criptas intestinais, características intrínsecas da NE (PARISH, 1961a). A imunidade humoral tem sido descrita como a principal forma de proteção ao desenvolvimento da NE, podendo ela ser induzida pela vacinação com toxóides ou pela utilização de cepas vivas atenuadas de *C. perfringens* (THOMPSON et al., 2006; COOPER; SONGER, 2009).

A resposta imune e a lesão tecidual frente à infecção por *Eimeria* spp. e *C. perfringens* diferem entre si pelas características morfológicas distintas dos patógenos, patogêneses diferentes que envolvem células inflamatórias também diferentes que irão liberar citocinas que farão a modulação do sistema imune para cada tipo de patógeno; isto se traduz, por sua vez, pelas diferentes respostas dos hospedeiros infectados ao estresse. Ressalte-se que o estresse modula a produção das citocinas, entre outros mecanismos relevantes, via ativação do eixo HPA e liberação de corticosterona. Desta forma, há que se concluir que os fenômenos imunomodulação devam ser distintos em cada um dos grupos experimentais usados no presente trabalho.

Quer nos parecer que as relações imunes observadas durante o curso da co-infecção por *C. perfringens* e *Eimeria* spp. sejam muito complexas, podendo apresentar variação de resultados na dependência do número de cepas de *Eimeria* spp. envolvidas e da característica genotípica do *C. perfringens*. Park et al. (2008) mostraram que a infecção por *C. perfringens* aumentou a expressão das citocinas IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-12, IL-13, IL-17 e TGF- β 4, enquanto que a co-infecção por *Eimeria maxima* e *C. perfringens* reduziu os níveis de todas estas citocinas. Hong et al. (2006) verificaram, após infecção por *Eimeria máxima*, a ocorrência tanto de aumento da expressão de citocinas Th1 como IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-15, IL-17, e IL-18, quanto a expressão de citocinas Th2, como IL-3, IL-10, IL-13. Em outro estudo, Hong et al. (2006a), sugeriram, após uma infecção primária por *Eimeria acervulina*, a ocorrência de um aumento dos níveis de IFN- γ , IFN- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-16, IL-17 e IL-18. Nosso estudo mostrou que as expressões dos níveis de citocinas variaram de acordo com a porção intestinal analisada; observamos um aumento de expressão de citocinas no duodeno e, curiosamente, uma diminuição de sua expressão no jejuno e no íleo como, por exemplo, para o IFN- γ . Além disso, as variações nas expressões de citocinas apresentaram correlações distintas entre si em cada porção intestinal. Portanto, trata-se de um quadro complexo que não deve ser encarado de forma simplista.

Importante comentar a ausência correlações bem definidas entre as citocinas, quando observamos os dados dos animais dos grupos controle. Quando da aplicação do estresse por calor (grupo C/HS35), as citocinas IFN- α , IL-2 e IL-10 apresentaram uma alta correlação positiva no jejuno e no íleo. Esta correlação mostra que o estresse por calor aumentou a resposta Th2. A IL-2 é responsável pelo aumento de IFN- α , uma importante citocina envolvida com as respostas virais; já a IL-10 inibe a resposta dos macrófagos, inibe a resposta Th1 e estimula as células B. No jejuno observamos, ainda, uma participação da IL-4 e da IL-13 no quadro; estas citocinas têm sido implicadas, respectivamente, como sendo responsáveis por alterações na classe de imunoglobulinas secretadas pelo linfócito B e pela estimulação das células de Goblet. No íleo dos animais do grupo C/HS35 também constatamos uma participação da IL-4. Desta forma, quer nos parecer que o estresse por calor tenha modulado o padrão Th1/Th2 de citocinas no intestino, como descrito em mamíferos (MIN et al., 2001). Este fato pode estar relacionado com o aumento das células de Goblet (KONDO et al., 2002) e com a produção de muco (CALEFI et al., 2014). Ao avaliar os dados provenientes da tonsila cecal dos animais do grupo C/HS35, foi possível confirmar o aumento de resposta Th2 pela alta correlação positiva observada entre IL-2, IL-10 e IL-12, que estão envolvidas na estimulação da resposta Th2, bem como por IL-13, IL-16 e TNF- α , derivadas da resposta Th2 para estimulação de macrófagos e células endoteliais.

A infecção por *Eimeria* (Grupo Ei) induziu uma resposta Th2 discreta, sendo que cada porção intestinal apresentou distintos padrões de correlações entre as citocinas. Tais variações podem ser tentativamente explicadas pela diversidade de cepas empregadas, uma vez que cada cepa de *Eimeria* tem preferência por infectar porções específicas do intestino. A aplicação do estresse por calor nos animais do grupo Ei/HS35 aumentou ainda mais a participação das citocinas nas respostas Th2 no duodeno, jejuno, íleo e na tonsila cecal; de destacar-se as altas correlações positivas encontradas entre IL-4, IL-10, IL-12, IL-13. Saliente-se que o estresse fez com que o TGF- β apresentasse altos valores de correlação com as outras citocinas nas aves do grupo Ei/HS35, o que não foi observado naquelas do grupo Ei. Sabe-se que o TGF- β está envolvido no reparo das lesões da mucosa intestinal, sendo conhecido, também, por inibir a infecção por *Toxoplasma gondii* (HUNTER et al., 1995; ROBINSON et al., 2000). As correlações existentes entre as citocinas nos animais do grupo Ei/HS35 são prova suficiente de que a resposta imune direcionou

a inibição da infecção causada pela *Eimeria* spp., o que corroborou com os escores lesionais encontrados nas aves deste grupo; estes dados confirmam a redução do número de oocistos de *Eimeria* spp. liberados por animais estressados por calor, conforme observado por Banfield et al. (1998).

A infecção isolada por *C. perfringens* (grupo Cp), também estimulou a resposta Th2 no duodeno e no jejuno, a depreender-se das altas correlações positivas observadas entre IL-2 e IL-10. Outras citocinas também se mostraram envolvidas, pois observamos altas correlações positivas com a IL-2 e IL-10, sendo elas o IFN- α , INF- γ e IL-12 no duodeno e IL-16, LITAF e TGF- β no jejuno dos animais do grupo Cp. Estes dados mostram, mais uma vez, que a resposta tecidual varia conforme a porção intestinal estudada. Quanto ao estresse por calor, as aves do grupo Cp/HS35 não apresentaram altas correlações de agrupamento de citocinas no jejuno. No entanto, observou-se que prevalece uma resposta Th2 no íleo, provavelmente induzida pela maior lesão tecidual, detectada pelo aumento dos escores microscópicos de lesão. Da mesma forma que no intestino delgado, encontrou-se nas tonsilas cecais dos animais do grupo Cp uma alta correlação positiva entre as citocinas de padrão Th2; as aves do grupo Cp/HS35 não apresentaram qualquer tipo definido de padrão de citocinas, isto é, com altas correlações positivas. Este desarranjo de resposta nas aves do grupo Cp/HS35 pode estar relacionado a uma queda da resposta imune, importante neste caso para contra restar o processo infeccioso gerado pelo *C. perfringens*; isto explicaria as tendências de aumento de lesão intestinal nas aves do grupo Cp/HS35, em comparação com aquelas do grupo Cp. A redução significativa de T-bet nos animais do grupo C/HS35, quando comparados aos do grupo Cp, reforça os achados anteriormente discutidos; já que o T-bet é responsável pela coordenação da resposta Th1 e está envolvido na ponte estabelecida entre a imunidade inata e adaptativa (LAZAREVIC; GLIMCHER; LORD, 2013). Ou seja, os animais do grupo C/HS35 poderiam estar vivenciando uma redução na montagem da resposta adaptativa, resposta esta que seria necessária para o controle da infecção pelo *C. perfringens*.

O processo de co-infecção (grupos Ei+Cp e Ei+Cp/HS35) processo mais agressivo, com maior infecção intestinal e lesão tecidual, fez com que praticamente todas as citocinas aumentassem no intestino delgado dos animais desses grupos em comparação aos do grupo C. Novamente, observamos a formação de

agrupamentos de altas correlações positivas de citocinas com predominância do padrão Th2 no duodeno, jejuno, íleo e tonsila cecal dos animais do grupo Ei+Cp. Chama a atenção o fato de que, os animais do grupo Ei+Cp/HS35 passaram a ter altas correlações de LITAF com citocinas do padrão Th2 no jejuno e íleo dos animais. Sabe-se que a infecção por *Eimeria* spp. aumenta a expressão de LITAF pelos linfócitos intestinais (IELs) (HONG et al., 2006b). Sendo assim, o estresse por calor poderia estar induzindo uma resposta dos IELs, fazendo-os aumentar a expressão de LITAF; esta, por sua vez aumentaria a expressão de TNF dos macrófagos. Além disso, os animais do grupo Ei+Cp/HS35 também apresentaram redução nos escores de lesão, devido à redução do processo infeccioso por *Eimeria* spp o que, provavelmente, contribuiu para que o *C. perfringens* tivesse sua capacidade de infecção reduzida, uma vez que, como amplamente discutido, a *Eimeria* spp. atua como fator predisponente para o desenvolvimento do *C. perfringens*.

Diferente do encontrado nos grupos Cp e Cp/HS35, os animais dos grupos Ei/HS35 e Cp+Ei/HS35 apresentaram apenas tendências de aumento de T-bet quando comparados aos animais dos grupos Ei e Cp+Ei. Como o T-bet é um dos fatores responsáveis pela troca de classes de imunoglobulinas nos linfócitos B (DORFMAN et al., 2005), o aumento de sua expressão, atrelado ao direcionamento da resposta Th2 facilitaria uma resposta do tipo adaptativa. Este achado explicaria a diminuição observada nas lesões intestinais dos animais dos grupos estressados (grupos Ei/HS35 e Ei+Cp/HS35) quando comparados aos não estressados (grupos Ei e Ei+Cp).

Além das citocinas, outras moléculas também são conhecidas pela sua liberação e regulação quando da presença de estresse por calor; são elas as proteínas do choque térmico (HSP). Sabe-se que as HSPs são liberadas durante o estresse, sendo citoprotetoras (MORIMOTO; SANTORO, 1998). Outros trabalhos mostraram que as HSPs ativam a resposta de linfócitos B via TLR4-MyD88 (COHEN-SFADY et al., 2005) e que utilizam tanto TLR2 e TLR4 para a transdução do sinal intracelular (ASEA et al., 2002). O TLR4 está direcionado ao reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) relacionados às bactérias Gram negativas (HOSHINO et al., 1999) que são normalmente encontradas na microbiota intestinal do frango. O TLR2, por sua vez, foi relacionado ao reconhecimento de PAMPs, principalmente de bactérias Gram

positivas (*C. perfringens*) direcionando a produção de citocinas (UNDERHILL et al., 1999). Para que estes receptores desempenhem seu papel na ativação da transcrição de citocinas, faz-se necessária a presença do MyD88 (TAKEUCHI; HOSHINO; AKIRA, 2000) que desencadeia a ativação do NF- κ B. Sendo assim, o aumento da expressão de MyD88, TLR2 e TLR4 observado neste estudo no duodeno das aves estressadas por calor poderia indicar uma estimulação das células inflamatórias residentes da mucosa intestinal e ligadas à resposta imune inata, favorecendo, desta forma, a resposta contra a *Eimeria* spp.

Em suma, quer nos parecer que o estresse por calor via ativação do eixo HPA, com liberação de corticosterona, tenha direcionado uma resposta do tipo Th2 capaz de reduzir a patogenicidade da *Eimeria* spp. e, desta forma, facilitar o estabelecimento da co-infecção por *C. perfringens*. A complexidade das interações existentes entre as respostas geradas pelo estresse por calor e pelas infecções explicaria a diversidade dos efeitos que produziram sobre a expressão de citocinas e sobre as vias de sinalização intracelulares e receptores de membrana. De qualquer forma, depreende-se claramente a partir dos achados experimentais deste estudo que o estresse, apresenta caráter imunomodulador e não imunossupressor, fato que pode tanto favorecer quanto prejudicar o desenvolvimento de um agente infeccioso.

10 EFEITOS DO ESTRESSE POR CALOR SOBRE OS FENÓTIPOS DE LEUCÓCITOS CIRCULANTES E ESPLÊNICOS, PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS, BALANÇO DE CITOCINAS TH1/TH2/TH17 E EXPRESSÃO DE RECEPTORES DO TIPO TOLL, CCR6, CCR7, CX3CR1 NO BAÇO DE FRANGOS DE CORTE INFECTADOS POR *Clostridium perfringens* TIPO A COM OU SEM CO-INFECÇÃO POR *Eimeria* SPP.

10.1 INTRODUÇÃO

A enterite necrótica (NE) é uma doença multifatorial causada pelo *Clostridium perfringens* tipo A (PARISH, 1961b). O aumento da ocorrência desta doença nos últimos anos, tem sido associado a restrições regulatórias impostas à avicultura industrial, em especial, relacionadas à proibição do uso de alguns antimicrobianos (SHANE, 2005). Estas restrições coincidem, também e no tempo, com o aumento da ocorrência de coccidiose, uma doença parasitária causada pela *Eimeria* spp. Sabe-se ser a infecção por *Eimeria* spp. um importante fator predisponente da NE (DROUAL; FARVER; BICKFORD, 1995). De fato, lesões intestinais ligadas ao ciclo do parasita no intestino predispõem o desenvolvimento do *C. perfringens* que pode, então, desencadear o curso clínico da NE (VAN IMMERSEEL et al., 2004).

O desenvolvimento de vacinas para o controle da coccidiose e da infecção por *C. perfringens* tem sido descrito como uma das medidas mais eficazes para o controle dos quadros clínicos da doença (WILLIAMSON; TITBALL, 1993; VERMEULEN; SCHAAP; SCHETTERS, 2001; LOVLAND et al., 2004; COOPER; TRINH; SONGER, 2009b). A utilização de adjuvantes contendo citocinas, neste sentido, mostrou-se capaz de aumentar a resposta vacinal contra *Eimeria* spp. (MIN et al., 2001; HILTON; BEAN; LOWENTHAL, 2002). Este dado reforça a relevância dos conhecimentos relativos à dinâmica da participação o sistema imune sistêmico e/ou local na construção de medidas de controle da NE.

Park et al. (2008), sugeriram que *E. máxima* e *C. perfringens* atuam de forma sinérgica tanto no que diz respeito ao desenvolvimento da NE, como ao aumento de IL-8, IL-10, IL-15 e LITAF no intestino delgado de frangos de corte. Hong et al.

(2012) mostraram que a co-infecção por *E.maxima* e *C. perfringens* aumenta a expressão de IL-1 β , IL-6, IL-17F e TNFSF15 no baço. No entanto, embora estes estudos tenham identificado a participação das citocinas no curso da NE, eles não mencionaram ou comentaram o papel exercido por subpopulações de leucócitos neste processo de imunomodulação por citocinas.

Sabe-se que o estresse influencia os fenômenos de imunomodulação que se desenvolvem durante processos inflamatórios e infecciosos (QUINTEIRO-FILHO et al., 2012b). O estresse em aves é conhecido pela capacidade que possui de reduzir o consumo de ração (QUINTEIRO-FILHO et al., 2012a), de induzir lesão intestinal (BURKHOLDER et al., 2008; LAMBERT, 2009) e de influenciar a resposta imune (HONDA et al., 2015). Calefi et al. (2016c) verificaram que o estresse por calor modula os centros germinais (CGs) esplênicos durante o curso de uma infecção por *C. perfringens*, reduzindo os escores de lesão intestinal causados pelo mesmo. Por sua vez, Calefi et al. (2016b), mostraram que o processo de infecção intestinal causado pelo *C. perfringens* ativa uma via neuroimune por meio de uma modulação do eixo cérebro-intestino.

O presente trabalho analisa alguns fenômenos de imunomodulação que envolvem a expressão de citocinas e linfócitos esplênicos e circulantes, bem como a proliferação de linfócitos esplênicos de animais submetidos ao estresse por calor e co-infectados com *Eimeria* spp. e *C. perfringens* tipo A. Os dados apresentam bases neuroimunes para a compreensão do estresse por calor e os processos infecciosos regulando a imunidade sistêmica e esplênica como forma de direcionar bases racionais a melhoria do setor avícola.

10.2 MATERIAIS E MÉTODOS

10.2.1 Animais

Frangos de corte com um dia de vida foram alojadas em salas climatizadas nas dependências da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil. Um total de 56 frangos de corte machos (Cobb

500[®]) foram mantidas em câmaras isoladoras (Alesco, São Paulo, Brasil), contendo filtros de ar com alta eficiência na separação de partículas (HEPA), desde o primeiro (ED1) até o último dia experimental (ED23). As aves receberam água e ração *ad libitum*. A umidade relativa do ar foi monitorada e controlada (em não menos que 45%). Os animais foram mantidos e utilizados de acordo com as orientações e aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Brasil (n° 3071/2013).

10.2.2 Formação de grupos

No dia experimental 1 (ED1), os frangos foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos de cinco animais, sendo eles: grupo controle (C); grupo de animais infectados por *Eimeria* spp. (Ei); grupo de animais infectados com *C. perfringens*(Cp); grupo de animais co-infectados com *C. perfringens* e *Eimeria* spp. (Cp+Ei); grupo controle estressado por calor (C/HS35); grupo de animais infectados por *Eimeria* spp. e estressados por calor (Ei/HS35); grupo de animais infectados com *C. perfringense* estressados por calor (Cp/HS35); grupo de animais co-infectados com *C. perfringens* e *Eimeria* spp. e estressados por calor (Cp+Ei/HS35).

10.2.3 Protocolo de estresse por calor

Os frangos dos grupos estressados por calor (C/HS35, Ei/HS35, Cp/HS35, Cp+Ei/HS35) foram mantidos à temperatura ambiente de $34 \pm 1^\circ\text{C}$ a partir do ED17 e até o ED23. O estresse por calor foi realizado com ciclo de 12 h por dia, sendo 12 h de conforto térmico e 12 h de estresse por calor. Durante este período, as aves não estressadas por calor (C, Cp, Ei, Cp+Ei) foram mantidas em temperatura de conforto térmico.

10.2.4 Protocolo de infecção por *Eimeria* spp.

No ED18, os animais dos grupos Ei, Cp+Ei, Ei/HS35 e Cp+Ei/HS34 receberam a vacina BioCoccivet-R (Biovet, SP, Brasil), por gavagem, em uma concentração 30 vezes maior que aquela recomendada pelo fabricante. Esta vacina contém oocistos vivos de cepas precoces de *Eimeria acervulina*, *E. Brunetti*, *E. hagani*, *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. mivati*, *E. maxima* e *E. praecox*.

10.2.5 Preparo do inóculo e protocolo de infecção por *C. perfringens*

O presente protocolo foi adaptado daquele proposto por Calefi et al. (2014). Foi utilizada uma cepa patogênica de *C. perfringens* tipo A com o genótipo para produção das toxinas Tpel e α . Esta cepa bacteriana foi mantida em glicerol a -80°C até o início do cultivo. O inóculo foi produzido por dois cultivos alternativos preparados em meio de carne cozida (CMM, Becton, Dickinson and Company) e meio de infusão cérebro coração (BHI, Becton, Dickinson and Company, MD, EUA) com 2% de extrato de levedura (Becton, Dickinson and Company). As bactérias (1×10^8 ufc/mL) foram oferecidas aos frangos dos grupos Cp, Cp+Ei, Cp/HS35 e Cp+Ei/HS35 em comedouros de alumínio, do ED19 ao ED22, tendo-se empregado uma concentração final de aproximadamente 1×10^4 ufc/mL; para tanto, a cepa patogênica de *C. perfringens* tipo A foi misturada na ração na proporção 1:1 (v/v). Do ED1 a ED23, estes animais receberam ração própria para frangos de corte com teor de proteína bruta de 24%. Os restos de ração foram descartados diariamente, previamente ao fornecimento de um novo inóculo. As aves do grupo controle (C e C/HS35) foram alimentados apenas com ração comercial. Como se observa, a infecção ocorreu pela ingestão voluntária de alimento contendo o meio de cultura BHI contendo o *C. perfringens*.

10.2.6 Quantificação sérica de IgA, IgM e IgY

As quantificações dos níveis de IgA, IgM e IgY foram realizadas no ED21, empregando-se para tal produtos comerciais ELISA (Bethyl Laboratories, Montgomery, EUA). As concentrações de imunoglobulina no soro foram determinadas por interpolação em uma curva padrão, sendo expressas em nanogramas por mililitro de soro (ng/ml), tal como sugerido pelos fabricantes; os resultados foram multiplicados pelo fator de diluição utilizado no teste.

10.2.7 Extração de RNA total e síntese de cDNA

O RNA total das amostras do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e tonsila cecal esquerda dos animais foi extraído com auxílio do reagente Trizol (Invitrogen Canada Inc. Burlington, Ont., Canada), conforme descrito por Abdul Careem et al. (2006). Em seguida, o RNA total foi processado para síntese do cDNA, empregando-se um kit comercial para transcrição reversa conforme instruções do fabricante (iScript, Bio-rad, USA).

10.2.8 Quantificação das citocinas através de PCR em tempo real

O PCR em tempo real foi utilizado para quantificar a expressão relativa das citocinas nas amostras processadas de cDNA (1:10 em água tratada com DEPC). A sequência dos genes e primers utilizados está descrita no Quadro 10. As reações de PCR foram preparadas em um volume total de 20 µl, utilizando-se como marcador o SYBR Green Select (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). As reações foram processadas no equipamento StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). De forma breve, as condições de amplificação consistiram em pré-incubação por 10 min a 94°C, seguida de 60 ciclos a 95°C por 10 s, 54°C a 64°C para anelamento por 5 s e aquisição e elongação a 72°C por 10 s. A análise da

curva de melting foi realizada em três etapas; 95°C por 10 s, resfriamento até 55° C por 1 min e aquecimento a 97° C. A média geométrica do gene controle endógeno (genes da β -actina) foi utilizada para análise da expressão relativa. Empregou-se um ciclo limiar relativo (C_T) para determinar a expressão do gene alvo em relação ao controle sem tecido (calibrador). Para cada amostra, a média do C_T do gene alvo foi normalizada utilizando-se a fórmula $\Delta C_T = C_{T \text{ gene alvo}} - C_{T \text{ média GAPDH e } \beta\text{-actina}}$. Para determinação dos níveis de expressão relativa, a seguinte fórmula foi utilizada: $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{amostra})} - \Delta C_{T(\text{calibrador})}$; o valor obtido foi usado para cálculo de expressão relativa utilizando-se a expressão $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Quadro 10 - Sequências de primers utilizados para avaliação da expressão de citocinas e quimiocinas

RNA Alvo	Senso	Antisenso	Número de Acesso
β -actina	5'-CAACACAGTGCTGTCTGGTGG-3'	5'-ATCGTACTCCTGCTTGCTGAT-3'	X00162
IFN- α	5'-GACATCCTTCAGCATCTCTTCA-3'	5'-AGGCGCTGTAATCGTTGTCT-3'	AB021154
IFN- γ	5'-AGCTGACGGTGGACCTATTATT-3'	5'-GGCTTTGCGCTGGATTTC-3'	Y07922
IL-1 β	5'-TGGGCATCAAGGGCTACA-3'	5'-TCGGGTTGGTTGGTGATG-3'	Y15006
IL-2	5'-TCTGGGACCACTGTATGCTCT-3'	5'-ACACCACTGGGAAACAGTATCA-3'	AF000631
IL-6	5'-CAAGGTGACGGAGGAGGAC-3'	5'-TGGCGAGGAGGGATTCT-3'	AJ309540
IL-10	5'-CGGGAGCTGAGGGTGAA-3'	5'-GTGAAGAAGCGGTGACAGC-3'	AJ621614
IL-12	5'-AGACTCCAATGGGCAAATGA-3'	5'-CTCTTCGGCAAATGGACAGT-3'	NM_213571
IL-13	5'-CCAGGGCATCCAGAAGC-3'	5'-CAGTGCCGGCAAGAAGTT-3'	AJ621735
IL-17	5'-CTCCGATCCCTTATTCTCTC-3'	5'-AAGCGGTTGTGGTCCTCAT-3'	AJ493595
LITAF	5'-TGTGTATGTGCAGCAACCCGTAGT -3'	5'-GGCATTGCAATTTGGACAGAAGT-3'	AY765397
TGF- β 4	5'-CGGGACGGATGAGAAGAAC-3'	5'-CGGCCCCACGTAGTAAATGAT -3'	M31160
TNFSF15	5'-CCTGAGTATTCCAGCAACGCA-3'	5'-ATCCACCAGCTTGATGTCACTAAC-3'	NM_01024578
CCR6	5'-TAGTTTGCCAGGTGCCCTAC-3'	5'-CTGCACCAAAGGTCCTTCAT-3'	NM_001114081.1
CCR7	5'-CCTGCATGGGACGGGAGGGA-3'	5'-GCTCTGCTGGCCGCCGTTAT-3'	XM_425875.2
CX3CR1	5'-TCCAGAACGATCAAGCACAG-3'	5'-CGGTGTTTCAGTTCCACATTG-3'	XM_418820.2
LITAF	5'-TGTGTATGTGCAGCAACCCGTAGT-3'	5'-GGCATTGCAATTTGGACAGAAGT-3'	AY765397
MIP3-a	5'-CTCGGAAGGTCATTAAGG-3'	5'-CTTAGGATTTACGCAGGC-3'	NM_204438
TLR2	5'-ATCCTGCTGGAGCCCATTCAGAG-3'	5'-TTGCTCTTCATCAGGAGGCCACTC-3'	XM_010710072
TLR4	5'-TGCCATCCCAACCAACCACAG-3'	5'-ACACCCACTGAGCAGCACCAA-3'	AY064697.1

Fonte: (CALEFI, 2016)

10.2.9 Imunofenotipagem de leucócitos circulantes e esplênicos

No ED21, os baços foram recolhidos em tubos cônicos contendo 4 mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, MO, EUA), sendo cortados em pedaços de aproximadamente 1 mm³. As células foram suavemente trituradas com o auxílio de um êmbolo de seringa. Os conteúdos foram transferidos para um tubo de poliestireno acoplado a filtro celular (Becton Dickinson, NJ, EUA) com malha de 0,7 µm. Os leucócitos foram contados numa câmara de Neubauer utilizando-se azul de tripan para exclusão de células mortas e determinação do número de células viáveis. O sangue foi colhido (4mL) pela punção da veia braquial empregando-se para tal uma seringa contendo anticoagulante.

Leucócitos esplênicos (1×10^6 células) e 25 µm de sangue total foram submetidos à lise dos eritrócitos por meio da adição de 2 ml de tampão de lise de FACS (Becton Dickinson, NJ, EUA) durante 5 min a 37°C.

Cada amostra foi estabilizada a 1×10^6 células por tubo (baço). Marcações simples foram realizadas utilizando-se os anticorpos diluídos em 1 a 3 µg em 100 µl de PBS (pH 7,4). Todos os anticorpos foram listados no item 9.2.11. A suspensão de células com os anticorpos foi mantida no escuro, a 4°C durante 45 min. Após o período de incubação, as células foram lavadas uma vez com 2 ml de PBS e centrifugadas a 400 g durante 8 minutos. As células foram, então, resuspensas em 100 µl de PBS para aquisição de fluorescência necessária para a citometria de fluxo ou para marcação com anticorpo secundário. Anticorpos não marcados ou anticorpos conjugados com biotina, seguiram incubação com anticorpo anti-camundongo-TexasRed e conjugado secundário estreptavidina-APC, respectivamente, no escuro a 4°C durante 45 minutos. Após o período de incubação, as células foram lavadas uma vez com 2 ml de PBS e centrifugadas a 400 g durante 8 minutos, sendo resuspensas em 100 µl de PBS para aquisição de fluorescência por citometria de fluxo.

Foi realizada uma marcação múltipla para identificação dos macrófagos/monócitos e subconjuntos de células T. As populações analisadas no baço foram CD28/CD8α/CD4, Bu1/CD44, CD4/CD25/CD44 e ChT1; aquelas analisadas no sangue periférico foram TCRγδ/CD8αα/CD4, CD28/CD8αβ/CD4, Bu-

1, monócitos (Kull)/MHCII. Os heterófilos foram identificados pelas características de tamanho e complexidade.

A aquisição dos eventos foi feita em um equipamento BD FACSCalibur (BD Biosciences CA, EUA). O equipamento está equipado com um laser azul 488 nm, que permite a detecção de três cores (filtros de banda 530/30, 575/26 e 650LP), e um laser de 635 nm, vermelho que permite uma detecção de cor (filtro 670LP). Um total de 10.000 eventos foram recolhidos para cada amostra. A titulação de todos os anticorpos foi realizada antes do experimento para determinação das concentrações ótimas de coloração; um painel multicolor foi produzido utilizando-se os controles de fluorescência-menos-um (FMO) e os controles de isotipo para cada fluoróforo. A análise dos dados obtidos foi realizada empregando-se o software FlowJo v10.0.7 (FlowJo, OR, EUA).

10.2.10 Ensaio de proliferação de Linfócitos B e T esplênicos

As células mononucleares separadas no item 9.2.9 foram marcadas com CFSE (5mM, Molecular Probes) por 5 minutos. Imediatamente após, estas células foram lavadas com solução fosfato contendo 5% de soro fetal bovino. As células foram, em sequência, resuspensas em 1 mL de meio RPMI acrescido de 10% de soro fetal bovino, 50 μ M de β -mercaptoetanol, 100 U/mL de streptomicina e 10 ug/mL de anfotericina B. Contou-se o número de células viáveis e 2×10^5 células foram adicionadas em triplicata em placa contendo 96 poços. Para cada animal foram feitas 3 triplicatas, sendo que uma correspondia ao controle não proliferado, um ao estimulado com concavalina A (10ug) e um estimulado com 1ug de lipopolissacarídeo. As células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 3 dias. Ao final do terceiro dia, cada triplicata de células foi misturada para compor uma amostra. As amostras seguiram para imunofenotipagem de CD4, CD8 e Bu1 empregando-se para talos anticorpos e fluorófilos descritos no item 9.2.11. Para cada amostra analisada no citômetro de fluxo, foram armazenados 10.000 eventos empregando-se o programa CellQuest[®] (BD). A partir desse protocolo, foram obtidos os dados de número e porcentagem de células das diferentes populações avaliadas; os resultados obtidos foram analisados com o auxílio do programa FlowJo[®]. Para

determinação das amostras positivas empregaram-se controles deisotipo para todos os fluorófilos. A determinação do índice de proliferação foi realizada por meio da relação da média geométrica das células sem estímulo com aquela das células com estímulo.

10.2.11 Anticorpos

Os anticorpos para detectar macrófagos e células apresentadoras de antígeno foram analisados como segue: camundongo anti-monócitos/macrófagos de galinha, clone KUL01; rato anti-MHC classe II de galinha, clone 2G11. Os anticorpos usados para detectar os linfócitos foram os seguintes: humano anti-CD25 de galinha, clone 13504; camundongo anti-TCR $\gamma\delta$ de galinha, clone TCR-1; camundongo anti-CD8 α de galinha, clone CT-8; rato anti-CD8 β de galinha, clone EP45; rato anti-CD28 de galinha, AV7 clone; rato anti-CD4 de galinha, clone CT-4; camundongo anti-Bu-1 de galinha, clone AV20. As IgG dos camundongos foram conjugadas com um dos seguintes fluorófilos: fluoresceína (FITC), R-fitoeritrina (R-PE), alofococianina (APC), vermelho espectral (SPRD), ou Alexa Fluor 647 (Alexa 647). Os anticorpos anti-CD25 foram adquiridos a AbD Serotec (Bio-Rad, NC EUA), os outros marcadores de células foram adquiridos pela SouthernBiotech (AL, EUA).

10.2.12 Análise Estatística

Os dados paramétricos foram analisados por meio de análise de variância multivariada (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey-Kramer (TukeyHSD), para comparações múltiplas. Os resultados não paramétricos foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis e teste de comparações múltiplas comparações entre os grupos (pacote *pgirmess*). Para a realização dos *heatmaps* foi utilizada função *heatmap.2* do pacote *gplots* (versão 2.12.1) empregando o software estatístico R versão 3.2.3. Foi utilizada a função *rdado* pacote *vegan* para a realização da análise do componente principal (PCA) empregando-se o software estatístico R versão 3.2.3.

Para a visualização das correlações entre as citocinas, empregou-se a técnica descrita por Hurley (2004) para visualização de dados multidimensionais. Para cada correlação obtida entre as citocinas instituiu-se um sistema de escores para os ranques dos valores de correlação absolutos para posterior construção de matriz de correlação. Os gráficos foram rearranjados próximos ao eixo diagonal com a permutação das variáveis e por proximidade entre os méritos, sendo agrupados quanto ao maior o nível de correlação. Os méritos atribuídos foram coloridos como: vermelho para o terço superior de mérito ($>0,7$; alta correlação), azul para o terço médio de mérito ($0,3$ a $0,7$) e amarelo para o terço inferior de mérito ($<0,3$). Foi descrito como padrão de transição, as matrizes de correlação que apresentaram a dispersão de gráficos vermelhos ao longo do eixo diagonal sem formar agrupamentos definidos. Desta forma, é possível visualizar se as correlações foram positivas ou negativas seguindo-se o sentido da dispersão dos pontos em cada gráfico. As análises estatísticas e os gráficos foram gerados empregando-se o pacote *gclus* no software estatístico R versão 3.2.3.

10.3 RESULTADOS

10.3.1 Quantificação sérica de IgA, IgM e IgY

A Figura 35 ilustra as concentrações séricas de IgA, IgM e IgY obtidas neste estudo. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais. No entanto, observa-se que o estresse por calor fez com que ocorresse tanto uma tendência para o aumento de IgA sérica, como uma redução dos níveis de IgY quando comparados aos respectivos grupos sem estresse por calor.

Figura 35 - Quantificação dos níveis séricos de IgA, IgM e IgY

FONTE: (CALEFI, 2016)

Legenda: Barras representam a expressão relativa média $\pm$ erro padrão por grupo. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

10.3.2 Expressão relativa das citocinas no baço de frangos de corte

A PCA ilustrada na Figura 36 mostra que os diferentes grupos experimentais distinguiram-se uns dos outros pela variação global das citocinas. Nota-se que os grupos C/HS35, Ei, Cp+Ei e Cp+Ei/HS35 apresentaram variações semelhantes nas expressões de citocinase que o estresse por calor fez com que os grupos C/HS35, Cp/HS35 e Ei/HS35 se posicionassem em quadrantes opostos aos respectivos grupos não estressados (grupos C, CP e Ei). A explicação para as maiores variações foi atribuída às citocinas IL-17 e TNFSF15.

Figura 36 - Análise dos componentes principais da expressão relativa das citocinas no baço dos frangos de corte

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: Sinal positivo ("+") representa o centroide de cada grupo experimental e circunferência representa o erro padrão de cada centroide. Grupo controle (C, vermelho); Grupo controle estressado por calor (C/HS35, laranja); grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei, azul); grupo infectado com *Eimeria* spp. estressado por calor (Ei/HS35, verde claro); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp, preto); grupo infectado com *Clostridium perfringens* estressado por calor (Cp/HS35, verde escuro); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp, cinza); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp estressado por calor (Ei+Cp, rosa).

A expressão das citocinas no baço está ilustrada na Figura 37. Os dados brutos foram apresentados no Apêndice C. Não se encontrou um padrão de

expressão de citocinas entre os diferentes grupos experimentais. No entanto, nota-se que os frangos do grupo C/HS35 apresentaram um aumento de praticamente todas as citocinas, com exceção do TNFSF15 e IL-4. Pode-se destacar, ainda, um aumento de citocinas padrão Th2 no grupo Cp/HS35 quando comparado ao grupo Cp. O mesmo pode ser observado nos grupos Ei e Cp+Ei comparados, respectivamente, aos grupos Ei e Cp+Ei.

Figura 37 - Heatmap com a expressão média de citocinas no baço

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: o heatmap foi colorido Segundo escala de cores. Os dados foram normalizados em relação a média do grupo controle (C), seguido por normalização para cada fenótipo. Os agrupamentos de linhas e colunas foi feito para identificar semelhanças entre os fenótipos e foi baseado na distância euclidiana e método de aglomeração completa. As distâncias são representadas pelos dendogramas nos eixos x e y do gráfico.

A análise de regressão multivariada (Figura 38) mostrou que o estresse por calor alterou o perfil das correlações entre as citocinas esplênicas. O grupo C/HS35 apresentou alta correlação positiva de citocinas padrão Th2 (Quadro 11), enquanto que o grupo C apresentou apenas uma tendência de correlação entre as citocinas padrão Th1. Embora o grupo Ei e Ei/HS35 não tenham apresentado agrupamentos

bem definidos de correlações elevadas de citocinas, observa-se que existe a alta correlação entre IL-10, IL-12 e IFN- α nos dois grupos. Os animais do grupo Cp apresentaram altas correlações positivas de citocinas de padrão Th1; as citocinas das aves do grupo Cp/HS35 mostraram um padrão de resposta Th17 com direcionamento para resposta padrão Th2 (Quadro 11). Por fim, os animais dos grupos Cp+Ei e Cp+Ei/HS35 não apresentaram agrupamentos bem definidos de citocinas com altas correlações; no entanto, quer nos parecer seja possível observar que o estresse por calor direcionou um padrão específico de correlação de citocinas Th17/Th2. Este padrão não encontrado nas aves do grupo Ei+Cp (Tabela 1).

Figura 38 - Painel com matriz de gráficos de dispersão para a expressão relativa de citocinas no baço por grupo

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: Variáveis são reordenadas utilizando algoritmo OSL1 na matriz de classificação de correlações absolutas. Os painéis de cores mostram o nível de classificação de correlação absoluta: rosa = terço superior, azul = terço médio, amarela = terço inferior. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp. (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

Quadro 11 - Grupos de citocinas com altas correlações positivas entre si no baço

Grupo	Agrupamento
C	IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-12, LITAF, TGF- β 4
C/HS35	IL-6, IL4 / IFN- α , IL-2, IL-10, IL-13, LITAF
Ei	Padrão de transição
Ei/HS35	Padrão de transição
Cp	IFN- α , IL-12, LITAF / IL-1, IL-2, TGF- β 4
Cp/HS35	IL-6, IL-17 / IFN- α , IFN- γ , IL-2, IL-10, LITAF
Ei+Cp	Padrão de transição
Ei+Cp/HS35	Padrão de transição

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: Informação resumida da matriz de correlação Figura 34. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

10.3.3 Expressão relativa de CCR6, CCR7 e CX3CR1

A Figura 39 ilustra a expressão relativa de CCR6, CCR7 e CX3CR1 no baço dos animais dos grupos experimentais. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as expressões relativas de CCR6, CCR7 e CX3CR1 quando comparadas às médias expressas nos outros grupos. No entanto, nota-se que as aves do grupo Cp/HS35 apresentaram marcante redução na

expressão de CCR6, CCR7 e CX3CR1 comparadas àquelas do grupo Cp; os animais dos grupos Ei e Ei/HS35 apresentaram menor expressão relativa de CX3CR1 quando comparados aos dos grupos C, C/HS35, Cp, Ei+Cp e Ei+Cp/HS35.

Figura 39 - Expressão relativa de CCR6, CCR7 e CX3CR1 no baço de frangos de corte

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: Barras representam a expressão relativa média $\pm$ erro padrão por grupo. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

10.3.4 Expressão relativa de TLR2 e TLR4

A Figura 40 ilustra a expressão relativa de TLR2 e TLR4 no baço dos animais dos grupos experimentais. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para as expressões relativas de TLR2 e TLR4. No entanto, observamos que os grupos Ei, Ei/HS35, Ei+Cp e Ei+Cp/HS35 apresentaram maior expressão de TLR4, enquanto que o grupo Cp/HS35 apresentou maior expressão de TLR2. Os demais grupos apresentaram médias próximas de expressão de TLR2 e TLR4.

Figura 40 - Expressão relativa de TLR2 e TLR4 no baço de frangos de corte

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: Barras representam a expressão relativa média $\pm$ erro padrão por grupo. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

10.3.5 Imunofenotipagem de leucócitos esplênicos

A imunofenotipagem dos leucócitos esplênicos realizada neste estudo revelou uma nítida diferença entre as populações de linfócitos dos frangos submetidos ao estresse por calor quando comparados àqueles não estressados (Figura 41). Após o estresse por calor observou-se aumento das populações de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$, uma redução na população de linfócitos B ($Bu1^+$), um aumento de população de linfócitos B ativados ($Bu1^+CD44^+$), uma redução da resposta de linfócitos T $CD8\alpha\beta^+$ não ativados ($CD28^-$), um aumento da resposta de linfócitos T $CD8\alpha\beta^+$ ativados

(CD28⁺), uma redução nas populações de linfócitos CD8 $\alpha\alpha$ ⁺, independente dos receptores CD4 e CD28, um aumento da população de linfócitos T regulatórios (CD4⁺CD25⁺), uma diminuição de população CD4⁺CD25⁺CD44⁺, e um aumento da população de linfócitos recém emigrantes do timo ChT1⁺. Os dados brutos foram apresentados no Apêndice C.

Figura 41 - Heatmap com as porcentagens médias das populações de linfócitos esplênicos

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: o heatmap foi colorido Segundo escala de cores. Os dados foram normalizados em relação a média do grupo controle (C), seguido por normalização para cada fenótipo. Os agrupamentos de linhas e colunas foi feito para identificar semelhanças entre os fenótipos e foi baseado na distância euclidiana e método de aglomeração completa. As distâncias são representadas pelos dendogramas nos eixos x e y do gráfico.

10.3.6 Ensaio de proliferação de linfócitos esplênicos

O ensaio de proliferação de linfócitos esplênicos realizado após o emprego de concavalina A está ilustrado na Figura 42; ela mostra que os frangos do grupo Cp apresentaram maior índice de proliferação de linfócitos B e T CD8⁺; ao aplicar o

estresse por calor (grupo Cp/HS35), no entanto, observou-se uma redução do índice de proliferação destes linfócitos B e T CD8⁺. De forma semelhante ao encontrado nos grupos Cp, o estresse por calor reduziu de forma significativa o índice de proliferação de linfócitos T CD8⁺ nos animais do grupo Ei/HS35 quando comparados ao grupo Ei. O oposto foi observado na população de linfócitos T CD4⁺, que apresentaram maiores índices de proliferação nas aves do grupo Ei/HS35 em relação àquelas do grupo Ei. O mesmo aumento foi encontrado nos frangos do grupo Ei+Cp/HS35 comparados aos do grupo Ei+Cp.

Figura 42 - Proliferação de linfócitos esplênicos estimulados com concavalina A

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: Barras representam o índice de proliferação médio $\pm$ erro padrão por grupo. * representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C. # representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo não estressado de mesmo tratamento. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

Quando se utilizou o lipopolissacarídeo (LPS) para estimular os linfócitos esplênicos observou-se que as células dos animais dos grupos que foram submetidos ao estresse por calor apresentaram maior índice de proliferação em relação aos do grupo não estressado (Figura 43). As diferenças observadas foram maiores nos grupos C/HS35 e Cp/HS35 comparados, respectivamente, aos grupos C e Cp que nos grupos Ei/HS35 e Ei+Cp/HS35 comparados aos grupos Ei e Ei+Cp, respectivamente.

Figura 43 - Proliferação de linfócitos esplênicos estimulados com lipopolissacarídeo

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: Barras representam o índice de proliferação médio $\pm$ erro padrão por grupo. * representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C. # representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo não estressado de mesmo tratamento. Grupo Controle (C); Grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

10.3.7 Imunofenotipagem de leucócitos circulantes

A Figura 44 ilustra as variações que foram encontradas nas populações de linfócitos T e B, de monócitos/macrófagos e de heterófilos no sangue periférico.

Como se depreende da leitura, o estresse por calor diminuiu as populações de linfócitos T $\text{TCR}\gamma\delta^+$ (TCR1^+), assim como aquela de monócitos (Kull^+) e de linfócitos B (Bu1^+); contrariamente, aumentou a população de linfócitos T CD4^+ , $\text{TCR}\gamma\delta^+$ ou não (Figura 44). As variações nas populações de heterófilos acompanhou aquela da população de monócitos, tendo-se observado alta expressão de MHC de classe II ($\text{Kull}^+\text{MHCII}^+$ high) (Figura 44). Os frangos dos grupos Cp e Ei+CP apresentaram população menor de $\text{Kull}^+\text{MHCII}^+$ low e maior de $\text{Kull}^+\text{MHCII}^+$ high quando comparados aos dos grupos Cp/HS35 e Ei+Cp/HS35 (Figura 44).

Figura 44 - Heatmap com as porcentagens médias das populações de linfócitos, monócitos/macrófagos e heterófilos circulantes

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: o heatmap foi colorido Segundo escala de cores. Os dados foram normalizados em relação a média do grupo controle (C), seguido por normalização para cada fenótipo. Os agrupamentos de linhas e colunas foi feito para identificar semelhanças entre os fenótipos e foi baseado na distância euclidiana e método de aglomeração completa. As distâncias são representadas pelos dendogramas nos eixos x e y do gráfico.

A análise das subpopulações de linfócitos T CD8 (Figura 45) revelou que o estresse por calor modulou as populações de linfócitos T CD8 $\alpha\alpha^+$ e CD8 $\alpha\beta^+$, independentemente dos receptores TCR $\delta\gamma^+$ e CD4 $^+$. O estresse aumentou as populações de linfócitos com receptor CD8 $\alpha\beta^+$, reduzindo aquelas de linfócitos comreceptores CD8 $\alpha\alpha^+$.

Figura 45 - Heatmap com as porcentagens médias das sub-populações de linfócitos CD8 $\alpha\alpha$ e CD8 $\alpha\beta$ circulantes

Fonte: (CALEFI, 2016)

Legenda: o heatmap foi colorido Segundo escala de cores. Os dados foram normalizados em relação a média do grupo controle (C), seguido por normalização para cada fenótipo. Os agrupamentos de linhas e colunas foi feito para identificar semelhanças entre os fenótipos e foi baseado na distância euclidiana e método de aglomeração completa. As distâncias são representadas pelos dendogramas nos eixos x e y do gráfico.

10.4 DISCUSSÃO

Os leucócitos esplênicos constituem um agrupamento de várias populações de linfócitos B e T, macrófagos e células dendríticas (DC) (JEURISSEN, 1993). Sabe-se serem os compartimentos esplênicos constituídos por populações específicas de células do sistema imune que estão envolvidas na apresentação de antígenos, montagem da resposta adaptativa e manutenção de células de memória (JEURISSEN, 1993). Desta forma, frente a um desafio antigênico ou em resposta a um estressor, o baço libera tipos celulares específicos para a circulação sistêmica. Além disso, são liberadas na corrente sanguínea proteínas, como as imunoglobulinas, que se dirigem a sítios onde existem infecções, podendo estas proteínas aparecer até mesmo, na luz intestinal via secreção biliar (LAWRENCE et al., 1981; ARAKAWA et al., 1996).

A maturação dos linfócitos B acontece nos CGs esplênicos (MACLENNAN, 2003). Estas regiões são conhecidas por serem suscetíveis aos efeitos do estresse por calor; elas produzem os diferentes tipos e concentrações de imunoglobulinas séricas (Calefi et al., 2016c). A razão da existência de variações entre as classes de anticorpos precisa, ainda, ser melhor esclarecida. Honda et al. (2015) mostraram que o estresse por calor aumentou os níveis séricos de IgM e IgY aos 7 dias de vida de aves de corte e, ainda, que o estresse por calor reduziu os níveis de IgY em frangos de corte analisados mais tardiamente (14 dias após estresse). Observamos em nosso estudo, uma tendência a uma redução dos níveis de IgY nos animais estressados por calor, enquanto que os níveis de IgA mostraram uma tendência para permanecer aumentados frente ao estresse por calor. Uma tendência de redução nas concentrações de IgM foi observada nos animais que foram estressados pelo calor, como visto ao se comparar os dados dos grupo Ei+Cp e Ei+Cp/HS35.

A análise das citocinas esplênicas mostrou que o estresse por calor direciona a expressão de citocinas para um padrão Th2, ou seja, direciona a resposta imune para um padrão humoral. Este resultado, embora pouco elucidado em aves, é amplamente aceito e reconhecido em mamíferos (IWAKABE et al., 1998). De fato, o desbalanço Th1/Th2 é um dos sinais da neuroimunomodulação em mamíferos (ELENKOV; CHROUSOS, 1999). A alta correlação de IL-6 e IL-4

encontrada nos frangos do grupo C/HS35 sugere que o estresse por calor *per se* seja, de fato, capaz de direcionar a resposta imune esplênica para um padrão Th2 em frangos de corte (DIEHL; RINCÓN, 2002). Sabe-se que a IL-6 aumenta a produção de IL-4 pelas células T CD4⁺ naive, as quais diferenciam-se, posteriormente, em células Th2 efectoras (RINCÓN et al., 1997; RINCÓN; FLAVELL, 1997; DIEHL; RINCÓN, 2002).

Além da confirmação do direcionamento da resposta para um padrão Th2 encontrado em nosso estudo após o estresse por calor, este trabalho mostrou a ocorrência de um direcionamento para uma resposta padrão Th17 (ZHAO et al., 2014). nas aves dos grupos infectados por *C. perfringens* (Cp/HS35 e Ei+Cp/HS35). Nos animais do grupo Cp/HS35, esta ativação se tornou mais evidente pela alta correlação observada entre IL-6 e IL-17; sabe-se que a ativação da resposta Th17 aumenta a expressão de IL-6, uma citocina conhecida em mamíferos como um componente importante e necessário para a expressão do comportamento tipo depressivo advindo da aplicação de alguns tipos de estresse prolongado (BLUTHÉ, 2000; HOWREN; LAMKIN; SULLS, 2009). Além disso, pode-se supor que a resposta Th17 observada nos animais infectados por *C. Perfringens* neste estudo, possa estar contribuindo para a polarização da resposta para um padrão Th2 (WENINK et al., 2009). Ivanov et al. (2009) mostraram que bactérias filamentosas segmentadas, como é o caso do *Clostridium*, desencadeiam respostas em células Th17 no intestino de camundongos. Sendo o gênero *Clostridium* um dos principais grupos de bactérias que colonizam a microbiota intestinal, quer nos parecer seja viável supor que a modulação intestinal observada nas aves deste estudo, possa estar relacionada à modulação esplênica pelas células Th17.

Sugeriu-se que a regulação da migração de células Th17 intestinais esteja relacionada à expressão de CCR6 (WANG et al., 2009; ZHAO et al., 2014), uma quimiocina expressa por células dendríticas imaturas, células T de memória e linfócitos B (WILLIAMS, 2006; WU; HU; KAISER, 2011). O ligante para este receptor é a proteína CCL20 (MIP-3 α), que é produzida pela ativação de células Th17 (HIROTA et al., 2007). Além disso, reportou-se que a ativação de células dendríticas (DCs) diminui a expressão de CCR6 e aumenta a expressão de CCR7 (WU; HU; KAISER, 2011). A resposta do receptor CCR7 aos ligantes CCL19 e CCL21 nas DCs causa a migração desta célula para órgãos linfóides secundários, nos quais

ocorre a apresentação de antígenos para as células T naive (KELLERMANN et al., 1999; SANCHEZ-SANCHEZ; RIOL-BLANCO; RODRIGUEZ-FERNANDEZ, 2006). A diminuição da expressão de CCR7 no baço tem sido relacionada à ativação de células T CD8⁺, fato este considerado importante para a liberação de células efectoras da polpa branca do baço (UNSOELD et al., 2004). Nosso estudo não evidenciou uma relação entre as expressões de CCR6 e CCR7 no baço; no entanto, o estresse por calor *per se* diminuiu estes receptores nos frangos do grupo Cp/HS35 quando comparados aos do grupo Cp. Demais disso, observamos ocorrência de uma diminuição da expressão do receptor CX3CR1, um indicador de ativação de DCs (BOGUNOVIC et al., 2009). Isso nos permite sugerir que a associação entre o estresse por calor e a infecção por *C. perfringens* poderia estar diminuindo a migração de DCs para o baço ou, quem sabe até, reduzindo a ativação das mesmas. Quer nos parecer, também que não se possa descartar a ocorrência de uma ativação de células T de memória com consequente redução da expressão de CCR6, como sugerido por Cook et al. (2000) em outro contexto experimental. Além disso, o grupo de aves Cp/HS35 apresentou menor expressão de TLRs no baço; estes receptores estão relacionados ao reconhecimento de padrões associados a patógenos (PAMPs) presentes tanto em macrófagos, quanto em células dendríticas (KAWAI; AKIRA, 2010).

É de amplo conhecimento que a ativação dos diferentes TLRs se faz de acordo com o tipo de antígeno (AKIRA; TAKEDA, 2004). O TLR2 foi relacionado ao reconhecimento de PAMPs, principalmente de bactérias Gram positivas (*C. perfringens*) (UNDERHILL et al., 1999). Já o TLR4 foi relacionado ao reconhecimento de PAMPs de bactérias Gram negativas (HOSHINO et al., 1999). A ativação destes receptores culmina com a produção de citocinas que, por sua vez, atuarão na ativação dos linfócitos T (PASARE; MEDZHITOV, 2005). Observou-se que um processo infeccioso tende a aumentar a expressão de TLR4 (Lu et al., 2009). Este aumento foi também observado no presente estudo; de fato, com exceção do grupo Cp/HS35, que apresentou maior expressão de TLR2, mostramos maior expressão das subfamílias de TLR4 na maioria das aves dos grupos experimentais. No entanto, não detectamos quaisquer influências do estresse por calor *per se* sobre a modulação da expressão dos TLRs.

A modulação de citocinas e de receptores não se dá de forma isolada; para que ocorram, é necessário que algumas modificações aconteçam na dinâmica quer das subpopulações de células T quer das células apresentadoras de antígenos (GEHR; BRAUN; LESSLAUER, 1992). O direcionamento da resposta de citocinas Th2 no baço observado neste estudo, foi acompanhado por aumento da população de linfócitos B ativados (Bu1⁺CD44⁺) que, por sua vez, também foi acompanhado pelo aumento da resposta de linfócitos T citotóxicos (CD28⁺CD8αβ⁺). Este direcionamento para a ativação de linfócitos citotóxicos poderia explicar a redução da infecção por *Eimeria* spp., observada neste estudo, em especial pela manutenção da imunidade de proteção contra o parasita; de fato, populações de linfócitos T CD8⁺ têm sido descritas como sendo a principal população celular relacionada à imunidade contra a *Eimeria* spp (LILLEHOJ; BACON, 1991; TROUT; LILLEHOJ, 1995). Outro fator importante que poderia contribuir para nossos achados experimentais é o aumento de populações de linfócitos T CD4⁺CD25. Sendo o CD25 o receptor da IL-2, um aumento como este poderia estar indicando uma maior população de linfócitos T CD4⁺ responsivos à IL-2, uma citocina relacionada com proliferação celular (TENG et al., 2006). Em aves, o fenótipo CD4⁺CD25⁺, já foi relacionado aos linfócitos T regulatórios (SHANMUGASUNDARAM; SELVARAJ, 2011), um tipo celular relacionado com a supressão da proliferação de linfócitos T efetores (SELVARAJ, 2013). Observamos, em nosso estudo, que o estímulo *in vitro* por LPS de esplenócitos provenientes de animais estressados por calor produziu uma maior proliferação de linfócitos T que o observado nas aves do grupo controle (grupo C) (Figura 41). Este fato foi evidenciado também em células CD4⁺ estimuladas pela ConA; no entanto, não foi observado nos demais fenótipos analisados (Figura 40). Quer nos parecer, então, seja válido sugerir que o aumento da população CD4⁺CD25⁺ não esteja relacionado com a população linfócitos T regulatórios, pois produziram uma redução na proliferação dos linfócitos *in vitro*.

O estresse por calor também foi responsável pelo aumento da população de linfócitos que apresentam o receptor ChT1. Este dado indica que o estresse por calor modulou a liberação dos linfócitos pelo timo dos frangos de corte. De fato, sabe-se que a presença do ChT1 indica que a célula é recém emigrada a este órgão (CHEN; CHANH; COOPER, 1984; KONG; CHEN; COOPER, 1998). Sendo assim, o estresse poderia estar modulando as populações de linfócitos tanto no timo quanto

no baço, fatos que levariam às variações que observamos nos fenótipos dos linfócitos provenientes do sangue periférico.

Embora com algumas particularidades, pode-se dizer que o aumento das populações de linfócitos T CD8⁺ que observamos no baço, também tenha ocorrido na circulação sistêmica. O estresse por calor aumentou principalmente a população de linfócitos TCRγδ⁺CD4⁺CD8⁺ em todos os grupos de animais, o que não foi observado na população de linfócitos TCRγδ⁺CD4⁻CD8⁺, mas foi encontrado nas populações de linfócitos TCRγδ⁻CD8⁺. Sabe-se que as células TCRγδ são as primeiras a serem observadas durante a ontogenia do timo (SOWDER, 1988); este fato, juntamente com o aumento relatado neste estudo para a expressão do ChT1, poderia indicar que o timo estaria participando da modulação das populações de linfócitos circulantes durante o estresse térmico por calor, conforme sugerido em outro contexto, por Kong, Chen e Cooper (1998). Além disso, sabe-se que populações de linfócitos interepiteliais TCRγδ⁺ são capazes de manter a integridade da mucosa intestinal e, também, que elas participam na redução dos processos infecciosos intestinais (KOMANO et al., 1995); estes fatos poderiam ter contribuído para a redução da lesão intestinal causada pelo *C. perfringens* e infecção por *Eimeria* spp por nós descritas no capítulo 8. Ademais, observamos que as populações de linfócitos T CD4⁺ também estavam aumentadas, o que também foi relatado por outros autores em infecções por *Eimeria* spp. (BESSAY et al., 1996). Os linfócitos T CD4⁺ são uma população de células que apresentam grande diversidade de subpopulações e que são reguladas durante a maioria dos processos infecciosos (ZHU; YAMANE; PAUL, 2010). Este aumento de linfócitos T CD4⁺ já foi relacionado com a manutenção da resposta imune, embora esta interpretação dependa da relação com os padrões de citocinas (STREET; MOSMANN, 1991). Dessa forma, pode-se dizer que o aumento de células T CD4⁺ observado neste estudo esteja modulando a expressão das citocinas descritas anteriormente (LI et al., 2009). Neste sentido, mostrou-se que o aumento das populações de linfócitos como, por exemplo, de linfócitos T citotóxicos é importante para neutralizar processos infecciosos intracelulares; este fato justificaria a redução na eliminação de oocistos relatada por Banfield et al. (1998) após aplicação de um estresse por calor. Esta mesma modulação poderia ser responsável pela redução dos efeitos inflamatórios do caldo tioglicolato em frangos de corte (CALEFI et al., 2014); especificamente, ela poderia

responder pela diminuição dos sinais da NE que relatamos durante um estresse por calor.

De forma evidente, o estresse por calor modulou as subpopulações de linfócitos T CD8⁺. As aves adultas apresentaram, em sua maioria, células TCRγδ⁺ com o receptor heterodímero CD8αβ⁺. Sabe-se que durante a fase pré-natal e embriológica o baço das aves apresenta em sua maioria o homodímero CD8αα⁺ (TREGASKES et al., 1995). A partir do baço do embrião de aves foi possível isolar uma população de células CD8αα⁺ que co-expressam CD25⁺, com o perfil de células NK (GOBEL, 2001). A exposição de aves a *Salmonella* fez com que ocorresse um aumento de linfócitos T CD8⁺, tanto CD8αβ⁺, quanto CD8αα⁺ (BERNDT; PIEPER; METHNER, 2006). Nosso estudo mostrou que o estresse por calor *per se* aumentou as populações de linfócitos contendo o receptor CD8αβ⁺, enquanto que as infecções por *C. perfringens* e *Eimeria* spp. aumentaram as populações de linfócitos CD8αα⁺. Sendo assim, quer nos parecer que o estresse por calor tenha aumentado o subtipo de linfócitos CD8⁺ mais comum em aves adultas (CD8αβ⁺), o que nos faz pensar que o estresse poderia estar, de alguma forma, acelerando o processo de maturação imune destas aves; alternativamente, poder-se-ia pensar que os linfócitos T CD8αβ⁺ sejam mais responsivos às citocinas que são moduladas pelo estresse por calor.

Pode-se induzir aumento da proliferação de linfócitos tanto pelas células dendríticas quanto pelos macrófagos (POZZI; MACIASZEK; ROCK, 2005). A análise das populações de monócitos (Kull⁺) circulantes realizada neste estudo revelou que o estresse por calor diminuiu a população Kull⁺MHCII^{low+} e não influenciou a população de Kull⁺MHCII^{high+}. Nossos resultados mostraram que a população Kull⁺MHCII^{high+} somente aumentou nos animais infectados por *C. perfringens*; segundo este achado, a infecção intestinal estaria modulando a circulação sistêmica de monócitos com alta expressão de MHC de classe II. Neste sentido, o aumento da expressão de MHC de classe II por monócitos pode ser produzido pela estimulação por IFN (KASPERS et al., 1994), e este aumento já foi relacionado a um aumento da atividade funcional de monócitos-macrófagos (QURESHI; BLOOM; DIETERT, 1989). Deste modo, o estresse por calor poderia ter diminuído a resposta dos monócitos, como por nós anteriormente observado (QUINTEIRO-FILHO et al., 2010), enquanto que a infecção por *C. perfringens* estimularia a resposta desses monócitos.

Em suma, quer nos parecer que o estresse por calor tenha modulado as populações de linfócitos no sangue circulante e baço. Especificamente, o estresse por calor incrementaria a resposta de monócitos e linfócitos T, principalmente T CD8 $\alpha\beta$, modulando a expressão de citocinas esplênicas para um padrão Th2, estimulando a proliferação de linfócitos *in vitro*.

11 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora seja de amplo conhecimento que o estresse por calor prejudique parâmetros produtivos de frangos de corte, não há na literatura uma definição clara deste comprometimento e do envolvimento neuroimune que se observa na vigência de um estresse por calor em associação com processos infecciosos ou parasitários. Nossos estudos mostraram que o estresse por calor aplicado a frangos de corte em modelos de NE pode tanto favorecer quanto piorar os sinais clínicos da doença; estes efeitos diferenciais foram, provavelmente, uma decorrência do tipo de modulação induzida pelo estressor na resposta do hospedeiro aos fatores predisponentes da infecção pelo *C. perfringens*. De fato, verificamos que o estresse por calor em frangos de corte infectados com *C. perfringens* e criados e mantidos em isoladores, reduziu a infecção pelo patógeno, a lesão tecidual por ele induzida, assim como as imunoglobulinas secretórias e a formação de centros germinais (CGs) no baço e no intestino delgado. Além disso, o estresse por calor e a NE alteraram o comportamento dos animais, ativando e modulando o perfil neuroquímico de monoaminas em algumas áreas do SNC, em especial naquelas relacionadas com a atividade do eixo HPA e com a expressão de comportamento doentio; estes dados reforçam a existência e a atuação do eixo cérebro-intestino em frangos de corte. Mostramos, em especial, que esta ativação estava atrelada à expressão de citocinas de padrão Th2 no intestino delgado e no baço. Este padrão de resposta Th2 foi acompanhado por alteração nos principais fenótipos de subpopulações de linfócitos T tanto na circulação sistêmica quanto no baço. Por tudo quanto exposto, fica evidente que o estresse por calor tem efeito neuroimunomodulador em frangos de corte. Este efeito se faria com participação relevante do eixo cérebro-intestino, influenciando a progressão dos sinais da NE, na dependência da resposta do hospedeiro ao *C. perfringens* e aos fatores predisponentes da infecção como, por exemplo, a co-infecção com *Eimeria* spp. ou a ingestão de caldo tioglicolato. Ficou demonstrado neste estudo que o estresse por calor de *per se* ativou o eixo HPA gerando um perfil neuroquímico cerebral compatível com aquele relatado em resposta a um estresse crônico ou na presença de comportamento doentio. A ativação do eixo HPA aumentou os níveis circulantes

de corticosterona; a corticosterona, por sua vez, atuou no processo inflamatório intestinal reduzindo a migração de heterófilos, e a expressão de citocinas de perfil Th2. Quer nos parecer que o processo inflamatório e as lesões teciduais produzidas pela NE também teriam modulado a neurotransmissão central em de regiões do SNC que controlam a atividade do eixo HPA. Desta forma, observamos um aumento circulante de corticosterona nestes animais, aumento este que também é compatível com o que tem sido relatado para outros estressores. Esta ativação do eixo HPA poderia ser compreendida como uma resposta orgânica à compressão de terminações nervosas aferentes, compressão esta decorrente do edema intestinal, da lesão tecidual. A ativação do eixo HPA poderia, também, estar ligada à sensibilização dessas fibras aferentes por mediadores inflamatórios. Alternativamente, ela poderia ser interpretada, ainda, como uma decorrência da liberação de mediadores inflamatórios na circulação sistêmica que, direta ou indiretamente ativariam áreas específicas do SNC ligadas á atividade do eixo HPA. Por certo, não se pode descartar uma associação destes mecanismos. Neste contexto, observou-se ativação do eixo HPA tanto em animais infectados quanto estressados pelo calor; logo, pode-se sugerir que o calor, a lesão tecidual e/ou a inflamação intestinal tenham atuado como estressores, agindo de forma sinérgica. Neste contexto, a intensa ativação do eixo HPA em decorrência deste sinergismo de estressores desencadearia uma resposta de *feedback* negativo sobre a liberação de ACTH pela hipófise e, conseqüentemente, diminuiria os níveis circulantes de corticosterona, fato por nós observado neste estudo. Além disso, e de relevância quer nos parecer que esta grande ativação do SNC e do sistema imune teriam repercutido também na microbiota intestinal das aves, em especial, reduzindo a patogênese do *C. perfringens* e da *Eimeria* spp. Acreditamos, frente a estes resultados ser possível sugerir que não exista apenas um eixo cérebro-intestino atuante em aves, mas sim um eixo cérebro-intestino-microbiota que, em seu conjunto, determinaria o curso clínico de doenças que acometem o intestino, como a NE e a coccidiose. Quer nos parecer que esses resultados mostrem que tanto o estresse por calor como a infecção intestinal modifiquem as atividades do SNC e/ou do sistema imune, influenciando direta ou indiretamente a manutenção do bem estar e o desempenho zootécnico de frangos de corte.

12 CONCLUSÕES

12.1 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

- O estresse térmico por calor reduz a inflamação, a adesão bacteriana e lesão intestinal em modelo experimental de NE por infecção isolada de *C. perfringens* e ingestão de caldo tioglicolato;
- O estresse térmico por calor reduz a formação de centros germinais no baço e duodeno, reduz a secreção de sIgA no intestino delgado, aumenta a circulação sistêmica de corticosterona em modelo experimental de NE por infecção isolada de *C. perfringens* e/ou ingestão de caldo tioglicolato;
- O estresse por calor e/ou inflamação intestinal aumentam a expressão de c-fos em núcleos cerebrais relacionados ao eixo HPA, alteram o comportamento dos frangos e aumentam a concentração sérica de corticosterona quando os animais são estressados por calor ou infectados, e reduzem a corticosterona sérica quando os animais são submetidos a múltiplos estressores simultaneamente (infecção + calor);
- O estresse por calor reduz a infecção por *Eimeria* spp. e *C. perfringens*, diminuindo os sinais clínicos da NE, aumentando a proliferação das células da cripta intestinal, reduz a secreção de sIgA no intestino delgado e aumenta a concentração sérica de corticosterona quando os animais são estressados por calor ou infectados, e reduzem a corticosterona sérica quando os animais são submetidos a múltiplos estressores simultaneamente (infecção + calor);
- O estresse por calor produz um perfil neuroquímico cerebral compatível com aqueles observados no estresse crônico, no comportamento doentio, e na vigência de sobrecarga do eixo HPA.
- O estresse por calor direciona a expressão de citocinas para um padrão Th2 assim como a expressão de receptor do tipo toll 4 no intestino e reduz a infecção por *Eimeria* spp. e *C. perfringens*, diminuindo os sinais clínicos da NE;

- O estresse por calor direciona a expressão de citocinas para um padrão Th2/Th17 e aumenta a proliferação de linfócitos no baço e aumenta a população de linfócitos T CD4⁺ e CD8αα⁺ circulantes.

12.2 CONCLUSÃO GERAL

O estresse por calor associado ou não a inflamação intestinal de origem infecciosa (*C. perfringens* e da *Eimeria* spp.) ou química (caldo tioglicolato) ativa o eixo HPA via mecanismos neuroimunes que envolvem a atividade do eixo cérebro-intestino-microbiota, direciona as citocinas para um padrão Th2 e, em decorrência, reduz os sinais clínicos da NE e/ou da coccidiose por interferir com a patogênese do *C. perfringens* e da *Eimeria* spp.

REFERÊNCIAS

- ADELL, A.; GARCIA-MARQUEZ, C.; ARMARIO, A.; GELPI, E. Chronic stress increases serotonin and noradrenaline in rat brain and sensitizes their responses to a further acute stress. **Journal of Neurochemistry**, v. 50, n. 6, p. 1678–1681, 1988.
- ADER, R. On the development of psychoneuroimmunology. **European Journal of Pharmacology**, v. 405, n. 1-3, p. 167–176, 2000.
- ADER, R.; COHEN, N.; FELTEN, D. Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system. **The Lancet**, v. 345, n. 8942, p. 99–103, 1995.
- AENGWANICH, W.; SIMARAKS, S. Pathology of heart, lung, liver and kidney in broilers under chronic heat stress. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, Thailand, v. 26, n. 3, p. 418, 2004.
- AGUILERA, G. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 15, n. 4, p. 321–350, 1994.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews. Immunology**, v. 4, n. 7, p. 499–511, 2004.
- AL-SHEIKHLY, F.; AL-SAIEG, A. Role of Coccidia in the occurrence of necrotic enteritis of chickens. **Avian Diseases**, v. 24, n. 2, p. 324–333, 1980.
- AL-SHEIKHLY, F.; TRUSCOTT, R. B. The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of crude toxins of *Clostridium perfringens* into the duodenum. **Avian Diseases**, v. 21, n. 2, p. 241–255, 1977.
- AL-SHEIKLY, F.; TRUSCOTT, R. B. The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of both cultures of *Clostridium perfringens* into the duodenum. **Avian Diseases**, v. 21, p. 230–240, 1977.
- ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. Neuroimunomodulação: sobre o diálogo entre os sistemas nervoso e imune. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29, n. 4, 2007.
- ANNETT, C. B.; VISTE, J. R.; CHIRINO-TREJO, M.; CLASSEN, H. L.; MIDDLETON, D. M.; SIMKO, E. Necrotic enteritis: effect of barley, wheat and corn diets on proliferation of *Clostridium perfringens* type A. **Avian Pathology**, v. 31, n. 6, p. 598–601, 2002.
- ANTONI, F. A. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. **Endocrine Reviews**, v. 7, n. 4, p. 351–378, 1986.
- ARAKAWA, H.; FURUSAWA, S.; EKINO, S.; YAMAGISHI, H. Immunoglobulin gene hyperconversion ongoing in chicken splenic germinal centers. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 10, p. 2540–2546, 1996.

ARANCIBIA, S.; RAGE, F.; ASTIER, H.; TAPIA-ARANCIBIA, L. Neuroendocrine and autonomous mechanisms underlying thermoregulation in cold environment. **Neuroendocrinology**, v. 64, n. 4, p. 257–267, 1996.

ARBORELIUS, L.; CHERGUI, K.; MURASE, S.; NOMIKOS, G. G.; BACKLUND HÖÖK, B.; CHOUVET, G.; HACKSELL, U.; SVENSSON, T. H. The 5-HT_{1A} receptor selective ligands, (R)-8-OH-DPAT and (S)-UH-301, differentially affect the activity of midbrain dopamine neurons. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 347, n. 4, p. 353–362, 1993.

ARNSTEN, A. F. Catecholamine modulation of prefrontal cortical cognitive function. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 2, n. 11, p. 436–447, 1998.

ASEA, A.; REHLI, M.; KABINGU, E.; BOCH, J. A.; BARE, O.; AURON, P. E.; STEVENSON, M. A.; CALDERWOOD, S. K. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 17, p. 15028–15034, 2002.

AUERNHAMMER, C. J.; STRASBURGER, C. J. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on the immune system. **European Journal of Endocrinology**, v. 133, n. 6, p. 635–645, 1995.

AXELROD, J.; REISINE, T. Stress hormones: their interaction and regulation. **Science**, v. 224, n. 4648, p. 452–459, 1984.

BAEUERLE, P. A.; BALTIMORE, D. NF-kappa B: ten years after. **Cell**, v. 87, n. 1, p. 13–20, 1996.

BAINS, B. S. Necrotic enteritis of chickens. **Australian Veterinary Journal**, v. 44, n. 1, p. 40, 1968.

BALAUCA, N. [Experimental reproduction of necrotic enteritis in the chicken. 1. Mono- and polyinfections with *Clostridium perfringens* and coccidia with reference to cage management]. **Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin**, v. 30, n. 6, p. 903–912, 1976.

BALE, T. L.; ANDERSON, K. R.; ROBERTS, A. J.; LEE, K.-F.; NAGY, T. R.; VALE, W. W. Corticotropin-releasing factor receptor-2-deficient mice display abnormal homeostatic responses to challenges of increased dietary fat and cold. **Endocrinology**, v. 144, n. 6, p. 2580–2587, 2003.

BANFIELD, M. J.; DOESCHATE, R. A. H. M. TEN; FORBES, J. M. Effect of whole wheat and heat stress on a coccidial infection in broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 39, p. 25–26, 1998. Supplement, 1.

BARTEL, D. P.; SHENG, M.; LAU, L. F.; GREENBERG, M. E. Growth factors and membrane depolarization activate distinct programs of early response gene expression: dissociation of fos and jun induction. **Genes & Development**, v. 3, n. 3, p. 304–313, 1989.

BASSO, A. S.; COSTA-PINTO, F. A.; BRITTO, L. R.; DE SA-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J. Neural pathways involved in food allergy signaling in the mouse brain: role of capsaicin-sensitive afferents. **Brain Research**, v. 1009, n. 1-2, p. 181–188, 2004.

BASSO, A. S.; PINTO, F. A.; RUSSO, M.; BRITTO, L. R.; DE SA-ROCHA, L. C.; PALERMO NETO, J. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. **Journal of Neuroimmunology**, v. 140, n. 1-2, p. 69–77, 2003.

BERCZI, I. The stress concept and neuroimmunoregulation in modern biology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 851, p. 3–12, 1998.

BERKENBOSCH, F.; VAN OERS, J.; DEL REY, A.; TILDERS, F.; BESEDOVSKY, H. Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. **Science**, v. 4826, n. 238, p. 524–526, 1987.

BERNDT, A.; PIEPER, J.; METHNER, U. Circulating gamma delta T cells in response to *Salmonella enterica* serovar enteritidis exposure in chickens. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 7, p. 3967–3978, 2006.

BERNIER, G.; PHANEUF, J. B.; FILION, R. Necrotic enteritis in broiler chickens. III. Study of the factors favoring the multiplication of *Clostridium perfringens* and the experimental transmission of the disease. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 41, n. 1, p. 112–116, 1977.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Feed-back interactions between immunological cells and the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. **The Netherlands Journal of Medicine**, v. 39, n. 3-4, p. 274–280, 1991.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 1, p. 64–102, 1996.

BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E.; FELIX, D.; HAAS, H. Hypothalamic changes during the immune response. **European Journal of Immunology**, v. 7, n. 5, p. 323–325, 1977.

BESSAY, M.; LE VERN, Y.; KERBOEUF, D.; YVORÉ, P.; QUÉRÉ, P. Changes in intestinal intra-epithelial and systemic T-cell subpopulations after an *Eimeria* infection in chickens: comparative study between *E. acervulina* and *E. tenella*. **Veterinary Research**, v. 27, n. 4-5, p. 503–514, 1996.

BJERRUM, L.; PEDERSEN, A. B.; ENGBERG, R. M. The influence of whole wheat feeding on *Salmonella* infection and gut flora composition in broilers. **Avian Diseases**, v. 49, n. 1, p. 9–15, 2005.

BLALOCK, J. E.; COSTA, O. Immune neuroendocrine interactions: implications for reproductive physiology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 564, p. 261–266, 1989.

BLUTHÉ, R. Role of IL-6 in cytokine-induced sickness behavior a study with IL-6 deficient mice. **Physiology & Behavior**, v. 70, n. 3-4, p. 367–373, 2000.

BOGUNOVIC, M.; GINHOUX, F.; HELFT, J.; SHANG, L.; HASHIMOTO, D.; GRETER, M.; LIU, K.; JAKUBZICK, C.; INGERSOLL, M. A.; LEBOEUF, M.; STANLEY, E. R.; NUSSENZWEIG, M.; LIRA, S. A.; RANDOLPH, G. J.; MERAD, M. Origin of the lamina propria dendritic cell network. **Immunity**, v. 31, n. 3, p. 513–525, 2009.

BOJESEN, A. M.; PETERSEN, K. D.; NIELSEN, O. L.; CHRISTENSEN, J. P.; BISGAARD, M. Pasteurella multocida infection in heterophil-depleted chickens. **Avian Diseases**, v. 48, n. 3, p. 463–470, 2004.

BORSOI, A.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; CALEFI, A. S.; PIANTINO FERREIRA, A. J.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; FLORIO, J. C.; PALERMO-NETO, J. Effects of cold stress and Salmonella Heidelberg infection on bacterial load and immunity of chickens. **Avian Pathology**, v. 44, n. 6, p. 490–497, 2015.

BRANTON, S. L.; LOTT, B. D.; DEATON, J. W.; MASLIN, W. R.; AUSTIN, F. W.; POTE, L. M.; KEIRS, R. W.; LATOUR, M. A.; DAY, E. J. The effect of added complex carbohydrates or added dietary fiber on necrotic enteritis lesions in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 76, n. 1, p. 24–28, 1997.

BRANTON, S. L.; REECE, F. N.; HAGLER JR., W. M. Influence of a wheat diet on mortality of broiler chickens associated with necrotic enteritis. **Poultry Science**, v. 66, n. 8, p. 1326–1330, 1987.

BREBNER, K.; HAYLEY, S.; ZACHARKO, R.; PH, D.; MERALI, Z.; ANISMAN, H. Synergistic effects of interleukin-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α : central monoamine, corticosterone, and behavioral variations. **Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 6, p. 566–580, 2000.

BREUNER, C. W.; ORCHINIK, M. Plasma binding proteins as mediators of corticosteroid action in vertebrates. **The Journal of Endocrinology**, v. 175, n. 1, p. 99–112, 2002.

BREZINSCHKE, H. P.; FAESSLER, R.; KLOCKER, H.; KROEMER, G.; SGONC, R.; DIETRICH, H.; JAKOBER, R.; WICK, G. Analysis of the immune-endocrine feedback loop in the avian system and its alteration in chickens with spontaneous autoimmune thyroiditis. **European Journal of Immunology**, v. 20, n. 10, p. 2155–2159, 1990.

BROWN-BORG, H. M.; EDENS, F. W. In vivo neurotoxin administration alters immune responses in chickens (Gallus domesticus). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 1, n. 102, p. 177–183, 1992.

BURKHOLDER, K. M.; THOMPSON, K. L.; EINSTEIN, M. E.; APPELEGATE, T. J.; PATTERSON, J. A. Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to Salmonella enteritidis colonization in broilers. **Poultry Science**, v. 87, n. 9, p. 1734–1741, 2008.

CALEFI, A. S.; DE SIQUEIRA, A.; NAMAZU, L. B.; COSTOLA-DE-SOUZA, C.; HONDA, B. B. T.; FERREIRA, A. J. P.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; DA SILVA FONSECA, J. G.; PALERMO-NETO, J. Effects of heat stress on the formation of splenic germinal centres and immunoglobulins in broilers infected by *Clostridium perfringens* type A. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 171, p. 38–46, 2016a.

CALEFI, A. S.; FONSECA, J. G. DA S.; COHN, D. W. H.; HONDA, B. T. B.; COSTOLA-DE-SOUZA, C.; TSUGIYAMA, L. E.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; FERREIRA, A. J. P.; PALERMO-NETO, J. Gut-brain axis interactions during heat stress and avian necrotic enteritis. **Poultry Science**, p. pew021, 2016b.

CALEFI, A. S.; HONDA, B. T. B.; COSTOLA-DE-SOUZA, C.; DE SIQUEIRA, A.; NAMAZU, L. B.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; FONSECA, J. G. DA S.; ALOIA, T. P. A.; PIANTINO-FERREIRA, A. J.; PALERMO-NETO, J. Effects of long-term heat stress in an experimental model of avian necrotic enteritis. **Poultry Science**, v. 93, n. 6, p. 1344–1353, 2014.

CANTERAS, N. S.; SWANSON, L. W. Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 324, n. 2, p. 180–194, 1992.

CASTANON, J. I. R. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. **Poultry Science**, v. 86, n. 11, p. 2466–2471, 2007.

CHANDRATILLEKE, D.; HÀLA, K.; MARSH, J. A. Effects of in vivo thyroid hormone treatment on the expression of interleukin-2 receptors on avian splenocytes. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 3, n. 18, p. 203–210, 1996.

CHAPPELL, P.; SMITH, M.; KILTS, C.; BISSETTE, G.; RITCHIE, J.; ANDERSON, C.; NEMEROFF, C. Alterations in corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in discrete rat brain regions after acute and chronic stress. **The Journal of Neuroscience**, v. 6, n. 10, p. 2908–2914, 1986.

CHEN, C. H.; CHANH, T. C.; COOPER, M. D. Chicken thymocyte-specific antigen identified by monoclonal antibodies: ontogeny, tissue distribution and biochemical characterization. **European Journal of Immunology**, v. 14, n. 5, p. 385–391, 1984.

CHEN, P.; HOVER, C. VAN; LINDBERG, D.; LI, C. Central urocortin 3 and type 2 corticotropin-releasing factor receptor in the regulation of energy homeostasis: critical involvement of the ventromedial hypothalamus. **Neuropeptide GPCRs in Neuroendocrinology**, v. 3, n. 180, p. 71, 2012.

CHENG, H. W.; SINGLETON, P.; MUIR, W. M. Social stress differentially regulates neuroendocrine responses in laying hens: I. Genetic basis of dopamine responses under three different social conditions. **Psychoneuroendocrinology**, v. 28, n. 5, p. 597–611, 2003.

CHROUSOS, G. P. Stress and disorders of the stress system. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 5, n. 7, p. 374–381, 2009.

CIRIACO, E.; RICCI, A.; BRONZETTI, E.; MAMMOLA, C. L.; GERMANA, G.; VEGA, J. A. Age-related changes of the noradrenergic and acetylcholinesterase reactive nerve fibres innervating the pigeon bursa of Fabricius. **Annals of Anatomy**, v. 177, n. 3, p. 237–242, 1995.

COCKREM, J. F. Stress, corticosterone responses and avian personalities. **Journal of Ornithology**, v. 148, n. S2, p. 169–178, 2007.

COHEN-SFADY, M.; NUSSBAUM, G.; PEVSNER-FISCHER, M.; MOR, F.; CARMI, P.; ZANIN-ZHOROV, A.; LIDER, O.; COHEN, I. R. Heat shock protein 60 activates B cells via the TLR4-MyD88 pathway. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 6, p. 3594–3602, 2005.

COOK, D. N.; PROSSER, D. M.; FORSTER, R.; ZHANG, J.; KUKLIN, N. A.; ABBONDANZO, S. J.; NIU, X.-D.; CHEN, S.-C.; MANFRA, D. J.; WIEKOWSKI, M. T.; SULLIVAN, L. M.; SMITH, S. R.; GREENBERG, H. B.; NARULA, S. K.; LIPP, M.; LIRA, S. A. CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. **Immunity**, v. 12, n. 5, p. 495–503, 2000.

COOPER, K. K.; SONGER, J. G. Necrotic enteritis in chickens: a paradigm of enteric infection by *Clostridium perfringens* type A. **Anaerobe**, v. 15, n. 1-2, p. 55–60, 2009.

COOPER, K. K.; SONGER, J. G. Virulence of *Clostridium perfringens* in an experimental model of poultry necrotic enteritis. **Veterinary Microbiology**, v. 142, n. 3-4, p. 323–328, 2010.

COOPER, K. K.; THEORET, J. R.; STEWART, B. A.; TRINH, H. T.; GLOCK, R. D.; SONGER, J. G. Virulence for chickens of *Clostridium perfringens* isolated from poultry and other sources. **Anaerobe**, v. 16, n. 3, p. 289–292, 2010.

COOPER, K. K.; TRINH, H. T.; SONGER, J. G. Immunization with recombinant alpha toxin partially protects broiler chicks against experimental challenge with *Clostridium perfringens*. **Veterinary Microbiology**, v. 133, n. 1-2, p. 92–97, 2009.

CORDIER, A. Innervation of the bursa of Fabricius during embryogenesis and adult life. **Acta Anatomica**, Basel, v. 73, n. 1, p. 38–47, 1969.

COSTA-PINTO, F. A.; BASSO, A. S.; BRITTO, L. R. G.; MALUCELLI, B. E.; RUSSO, M. Avoidance behavior and neural correlates of allergen exposure in a murine model of asthma. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 19, n. 1, p. 52–60, 2005.

COSTA-PINTO, F. A.; PALERMO-NETO, J. Neuroimmune interactions in stress. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 3, p. 196–199, 2010.

COURSODON, C. F.; TRINH, H. T.; MALLOZZI, M.; VEDANTAM, G.; GLOCK, R. D.; SONGER, J. G. *Clostridium perfringens* alpha toxin is produced in the intestines of broiler chicks inoculated with an alpha toxin mutant. **Anaerobe**, v. 16, n. 6, p. 614–617, 2010.

COWEN, B. S.; SCHWARTZ, L. D.; WILSON, R. A.; AMBRUS, S. I. Experimentally induced necrotic enteritis in chickens. **Avian Diseases**, v. 31, p. 904–906, 1987.

CRAVEN, S. E. Colonization of the intestinal tract by *Clostridium perfringens* and fecal shedding in diet-stressed and unstressed broiler chickens. **Poultry Science**, v. 79, p. 843–849, 2000.

CRAVEN, S. E.; COX, N. A.; STERN, N. J.; MAULDIN, J. M. Prevalence of *Clostridium perfringens* in commercial broiler hatcheries. **Avian Diseases**, v. 45, n. 4, p. 1050–1053, 2001.

CULLINAN, W. E. GABA(A) receptor subunit expression within hypophysiotropic CRH neurons: a dual hybridization histochemical study. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 419, n. 3, p. 344–351, 2000.

CULLINAN, W. E.; HERMAN, J. P.; WATSON, S. J. Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 332, n. 1, p. 1–20, 1993.

CUNNICK, J. E.; KOJIC, L. D.; HUGHES, R. A. Stress-induced changes in immune function are associated with increased production of an interleukin-1-like factor in young domestic fowl. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 8, n. 2, p. 123–136, 1994.

CYR, N. E.; MICHAEL ROMERO, L. Chronic stress in free-living European starlings reduces corticosterone concentrations and reproductive success. **General and Comparative Endocrinology**, v. 151, n. 1, p. 82–89, 2007.

DAHIYA, J. P.; HOEHLER, D.; WILKIE, D. C.; VAN KESSEL, A. G.; DREW, M. D. Dietary glycine concentration affects intestinal *Clostridium perfringens* and lactobacilli populations in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 84, n. 12, p. 1875–1885, 2005.

DAHIYA, J. P.; WILKIE, D. C.; VAN KESSEL, A. G.; DREW, M. D. Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. **Animal Feed Science and Technology**, v. 129, n. 1-2, p. 60–88, 2006.

DANTZER, R.; O'CONNOR, J. C.; FREUND, G. G.; JOHNSON, R. W.; KELLEY, K. W. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 46–56, 2008.

DAWKINS, M. S.; DONNELLY, C. A.; JONES, T. A. Chicken welfare is influenced more by housing conditions than by stocking density. **Nature**, v. 427, n. 6972, p. 342–344, 2004.

DE SOUZA, H.; PALERMO-NETO, J. A biochemical study of cholinergic-dopaminergic interactions in the central nervous system. **General Pharmacology**, v. 16, n. 5, p. 533–536, 1985.

DEBUT, M.; BERRI, C.; ARNOULD, C.; GUEMENE, D.; SANTE-LHOUTELLIER, V.; SELLIER, N.; BAEZA, E.; JEHL, N.; JEGO, Y.; BEAUMONT, C.; LE BIHAN-DUVAL,

E. Behavioural and physiological responses of three chicken breeds to pre-slaughter shackling and acute heat stress. **British Poultry Science**, v. 46, n. 5, p. 527–535, 2005.

DEL REY, A.; WELSH, C. J.; SCHWARZ, M. J.; BESEDOVSKY, H. O. Foreword for Neuroimmunomodulation in health and disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1261, p. vii–viii, 2012.

DENG, W.; DONG, X. F.; TONG, J. M.; ZHANG, Q. The probiotic *Bacillus licheniformis* ameliorates heat stress-induced impairment of egg production, gut morphology, and intestinal mucosal immunity in laying hens. **Poultry Science**, v. 91, n. 3, p. 575–582, 2008.

DENNO, K. M.; MCCORKLE, F. M.; TAYLOR JR., R. L. Catecholamines modulate chicken immunoglobulin M and immunoglobulin G plaque-forming cells. **Poultry Science**, v. 73, n. 12, p. 1858–1866, 1994.

DERIJK, R.; STERNBERG, E. M. Corticosteroid action and neuroendocrine-immune interactions. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 746, p. 33–37, 1994.

DE-SOUZA, H.; PALERMO-NETO, J. Effects of alpha-adrenergic blocking agents on stereotyped behavior induced by apomorphine in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 15, n. 2-3, p. 143–146, 1982.

DEVICHE, P.; CORTEZ, L. Androgen control of immunocompetence in the male house finch, *Carpodacus mexicanus* Müller. **Journal of Experimental Biology**, v. 208, n. 7, p. 1287–1295, 2005.

DHABHAR, F. S. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. **Immunologic Research**, v. 58, n. 2-3, p. 193–210, 2014.

DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B. S. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 11, n. 4, p. 286–306, 1997.

DHILLON, A. S.; ROY, P.; LAUERMAN, L.; SCHABERG, D.; WEBER, S.; BANDLI, D.; WIER, F. High mortality in egg layers as a result of necrotic enteritis. **Avian Diseases**, v. 48, n. 3, p. 675–680, 2004.

DIAB, S. S.; KINDE, H.; MOORE, J.; SHAHRIAR, M. F.; ODANI, J.; ANTHENILL, L.; SONGER, G.; UZAL, F. A. Pathology of *Clostridium perfringens* type C enterotoxemia in horses. **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 2, p. 255–263, 2012.

DIEHL, S.; RINCÓN, M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. **Molecular Immunology**, v. 39, n. 9, p. 531–536, 2002.

DOKLADNY, K.; MOSELEY, P. L.; MA, T. Y. Physiologically relevant increase in temperature causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290,

n. 2, p. G204–212, 2006.

DOMINGUES-JUNIOR, M.; PINHEIRO, S. R.; GUERRA, J. L.; PALERMO-NETO, J. Effects of treatment with amphetamine and diazepam on Mycobacterium bovis-induced infection in hamsters. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 22, n. 3, p. 555–574, 2000.

DONKOH, A. Ambient temperature: a factor affecting performance and physiological response of broiler chickens. **International Journal of Biometeorology**, v. 33, n. 4, p. 259–265, 1989.

DORFMAN, D. M.; HWANG, E. S.; SHAHSAFAEI, A.; GLIMCHER, L. H. T-bet, a T cell-associated transcription factor, is expressed in Hodgkin's lymphoma. **Human Pathology**, v. 36, n. 1, p. 10–15, 2005.

DREW, M. D.; SYED, N. A.; GOLDADE, B. G.; LAARVELD, B.; VAN KESSEL, A. G. Effects of dietary protein source and level on intestinal populations of Clostridium perfringens in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 83, n. 3, p. 414–240, 2004.

DROUAL, R.; FARVER, T. B.; BICKFORD, A. A. Relationship of sex, age, and concurrent intestinal disease to necrotic enteritis in turkeys. **Avian Diseases**, v. 39, n. 3, p. 599–605, 1995.

DUFFY, D. L.; BENTLEY, G. E.; DRAZEN, D. L.; BALL, G. F. Effects of testosterone on cell-mediated and humoral immunity in non-breeding adult European starlings. **Behavioral Ecology**, v. 11, n. 6, p. 654–662, 2000.

DUNN, A. J. Endotoxin-induced activation of cerebral catecholamine and serotonin metabolism: comparison with interleukin-1. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 261, n. 3, p. 964–969, 1992.

DUNN, A. J. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. **Clinical Neuroscience Research**, v. 6, n. 1-2, p. 52–68, 2006.

DUNN, A. J.; FILE, S. E. Cold restraint alters dopamine metabolism in frontal cortex, nucleus accumbens and neostriatum. **Physiology & Behavior**, v. 31, n. 4, p. 511–513, 1983.

DYLAG, K.; HUBALEWSKA-MAZGAJ, M.; SURMIAK, M.; SZMYD, J.; BRZOZOWSKI, T. Probiotics in the mechanism of protection against gut inflammation and therapy of gastrointestinal disorders. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 7, p. 1149-1115, 2013.

EDENS, F. W.; SIEGEL, H. S. Adrenal responses in high and low ACTH response lines of chickens during acute heat stress. **General and Comparative Endocrinology**, v. 25, n. 1, p. 64–73, 1975.

ELENKOV, I. J.; CHROUSOS, G. P. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 10, n. 9, p. 359–368, 1999.

ELENKOV, I. J.; CHROUSOS, G. P. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 966, p. 290–303, 2002.

EL-FAR, A. A.; MASHALY, M. M.; KAMAR, G. A. Bursectomy and in vitro response of adrenal gland to adrenocorticotrophic hormone and testis to human chorionic gonadotropin in immature male chickens. **Poultry Science**, v. 73, n. 1, p. 113–117, 1994.

EL-LETHEY, H.; HUBER-EICHER, B.; JUNGI, T. W. Exploration of stress-induced immunosuppression in chickens reveals both stress-resistant and stress-susceptible antigen responses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 95, n. 3-4, p. 91–101, 2003.

ELWINGER, K.; BERNDTSON, E.; ENGSTRÖM, B.; FOSSUM, O.; WALDENSTEDT, L. Effect of antibiotic growth promoters and anticoccidials on growth of *Clostridium perfringens* in the caeca and on performance of broiler chickens. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 39, n. 4, p. 433–441, 1998.

ENGAN, H.; SCHAGATAY, E. “Spleen contraction and hemoconcentration” regarding the review “Hemoconcentration and hemostasis during acute stress: interacting and independent effects” by Austin et al. 2011. **Annals of Behavioral Medicine: a publication of the Society of Behavioral Medicine**, v. 49, n. 4, p. 634–635, 2015.

ETCHES, R. J.; JOHN, T. M.; GIBBINS, A. M. V.; DAGHIR, N. J.; OTHERS. Behavioural, physiological, neuroendocrine and molecular responses to heat stress. **Poultry Production in Hot Climates**, v. 1, n. 1, p. 31–66, 2008.

FERREIRA, Z. S.; BOTHOREL, B.; MARKUS, R. P.; SIMONNEAUX, V. Plasma corticosterone elevation inhibits the activation of nuclear factor kappa B (NFkB) in the Syrian hamster pineal gland. **Stress**, v. 15, n. 3, p. 339–347, 2011.

FINLAY, J. M.; ZIGMOND, M. J.; ABERCROMBIE, E. D. Increased dopamine and norepinephrine release in medial prefrontal cortex induced by acute and chronic stress: Effects of diazepam. **Neuroscience**, v. 64, n. 3, p. 619–628, 1995.

FOWLES, J. R.; FAIRBROTHER, A.; FIX, M.; SCHILLER, S.; KERKVLIT, N. I. Glucocorticoid effects on natural and humoral immunity in mallards. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 17, n. 2, p. 165–177, 1993.

FRAME, D. D.; BICKFORD, A. A. An outbreak of coccidiosis and necrotic enteritis in 16-week-old cage-reared layer replacement pullets. **Avian Diseases**, v. 30, n. 3, p. 601–602, 1986.

FRANCHINI, A.; OTTAVIANI, E. Immunoreactive POMC-derived peptides and cytokines in the chicken thymus and bursa of Fabricius microenvironments: age-related changes. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 9, n. 11, p. 685–692, 1999.

FRANCI, O.; AMICI, A.; MARGARIT, R.; MERENDINO, N.; PICCOLELLA, E.

Influence of thermal and dietary stress on immune response of rabbits. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 7, p. 1523–1529, 1996.

FUKATA, T.; HADATE, Y.; BABA, E.; UEMURA, T.; ARAKAWA, A. Influence of *Clostridium perfringens* and its toxin in germ-free chickens. **Research in Veterinary Science**, v. 44, n. 1, p. 68–70, 1988.

FUKUDO, S. Role of corticotropin-releasing hormone in irritable bowel syndrome and intestinal inflammation. **Journal of Gastroenterology**, v. 42 Suppl 1, p. 48–51, 2007.

FURNESS, J. B.; KUNZE, W. A.; CLERC, N. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine, and immune responses. **The American Journal of Physiology**, v. 277, n. 5 Pt 1, p. G922–928, 1999.

GALA, R. R. Prolactin and growth hormone in the regulation of the immune system. **Experimental Biology and Medicine**, v. 198, n. 1, p. 513–527, 1991.

GARDINER, M. R. Clostridial infections in poultry in Western Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 43, n. 9, p. 359–360, 1967.

GARRIGA, C.; HUNTER, R. R.; AMAT, C.; PLANAS, J. M.; MITCHELL, M. A.; MORETO, M. Heat stress increases apical glucose transport in the chicken jejunum. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Compative Physiology**, v. 290, n. 1, p. R195–201, 2006.

GAUTIER, E. L.; IVANOV, S.; LESNIK, P.; RANDOLPH, G. J. Local apoptosis mediates clearance of macrophages from resolving inflammation in mice. **Blood**, v. 122, n. 15, p. 2714–2722, 2013.

GAYKEMA, R. P. A.; GOEHLER, L. E.; LYTE, M. Brain response to cecal infection with *Campylobacter jejuni*: analysis with Fos immunohistochemistry. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 18, n. 3, p. 238–245, 2004.

GEFFNER, M. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on T- and B-lymphocytes and immune function. **Acta Paediatrica Supplement**, Oslo, Norway, v. 423, p. 76–79, 1997.

GEHAD, A. E.; LILLEHOJ, H. S.; HENDRICKS III, G. L.; MASHALY, M. M. Initiation of humoral immunity. I. The role of cytokines and hormones in the initiation of humoral immunity using T-independent and T-dependent antigens. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 26, n. 8, p. 751–759, 2002.

GEHR, G.; BRAUN, T.; LESSLAUER, W. Cytokines, receptors, and inhibitors. **The Clinical Investigator**, v. 70, n. 1, p. 64–69, 1992.

GIBSON-CORLEY, K. N.; OLIVIER, A. K.; MEYERHOLZ, D. K. Principles for valid histopathologic scoring in research. **Veterinary Pathology Online**, v. 50, n. 6, p. 1007–1015, 2013.

GIL, J.; WEIBEL, E. R. Morphological study of pressure-volume hysteresis in rat lungs fixed by vascular perfusion. **Respiration Physiology**, v. 15, n. 2, p. 190–213, 1972.

GILLIES, G. E.; LINTON, E. A.; LOWRY, P. J. Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. **Nature**, v. 299, n. 5881, p. 355–357, 1982.

GLASER, R.; KIECOLT-GLASER, J. K. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. **Nature Reviews: Immunology**, v. 5, n. 3, p. 243–251, 2005.

GLEESON, M.; BRACKENBURY, J. H. Effects of body temperature on ventilation, blood gases and acid-base balance in exercising fowl. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, Cambridge, England, v. 69, n. 1, p. 61–72, 1984.

GLICK, B. Interrelation of the avian immune and neuroendocrine systems. **Journal of Experimental Zoology**, v. 3, n. 232, p. 671–82, 1984.

GLICK, B. Historical perspective: the bursa of Fabricius and its influence on B-cell development, past and present. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 30, n. 1, p. 3–12, 1991.

GOBEL, T. W. F. NK and T cells constitute two major, functionally distinct intestinal epithelial lymphocyte subsets in the chicken. **International Immunology**, v. 13, n. 6, p. 757–762, 2001.

GOLDER, H. M.; GEIER, M. S.; FORDER, R. E. A.; HYND, P. I.; HUGHES, R. J. Effects of necrotic enteritis challenge on intestinal micro-architecture and mucin profile. **British Poultry Science**, v. 52, n. 4, p. 500–506, 2011.

GOMES, A. V. S.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; RIBEIRO, A.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; PINHEIRO, M. L.; BASKEVILLE, E.; AKAMINE, A. T.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; FERREIRA, A. J. P.; PALERMO-NETO, J. Overcrowding stress decreases macrophage activity and increases Salmonella enteritidis invasion in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 43, n. 1, p. 82–90, 2014.

GRAVE, K.; KALDHUSDAL, M. C.; KRUSE, H.; HARR, L. M. F.; FLATLANDSMO, K. What has happened in Norway after the ban of avoparcin? Consumption of antimicrobials by poultry. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 62, n. 1, p. 59–72, 2004.

GREENBERG, M. E.; ZIFF, E. B.; GREENE, L. A. Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. **Science**, New York, N.Y., v. 234, n. 4772, p. 80–83, 1986.

GREGORY, N. G.; PAYNE, S. R.; DEVINE, C. D.; COOK, C. J. Effect of lipopolysaccharide on sickness behaviour in hens kept in cage and free range environments. **Research in Veterinary Science**, v. 87, n. 1, p. 167–170, 2009.

GRENHAM, S.; CLARKE, G.; CRYAN, J. F.; DINAN, T. G. Brain-gut-microbe

communication in health and disease. **Frontiers in Physiology**, v. 2, n. 94, p. 3389, 2011.

GRUNDY, D. Neuroanatomy of visceral nociception: vagal and splanchnic afferent. **Gut**, v. 51,, p. i2–5, 2002. Supplement, 1.

HADDAD, E. E.; MASHALY, M. M. Effect of thyrotropin-releasing hormone, triiodothyronine, and chicken growth hormone on plasma concentrations of thyroxine, triiodothyronine, growth hormone, and growth of lymphoid organs and leukocyte populations in immature male chickens. **Poultry Science**, v. 69, n. 7, p. 1094–1102, 1990.

HADDAD, E. E.; MASHALY, M. M. Chicken growth hormone, triiodothyronine and thyrotropin releasing hormone modulation of the levels of chicken natural cell-mediated cytotoxicity. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 15, n. 1-2, p. 65–71, 1991.

HARA, E.; KUBIKOVA, L.; HESSLER, N. A.; JARVIS, E. D. Role of the midbrain dopaminergic system in modulation of vocal brain activation by social context. **The European Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 11, p. 3406–3416, 2007.

HARMON, B. G. Avian heterophils in inflammation and disease resistance. **Poultry Science**, v. 77, n. 7, p. 972–977, 1998.

HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 12, n. 2, p. 123–137, 1988.

HECKERT, R. A.; ESTEVEZ, I.; RUSSEK-COHEN, E.; PETTIT-RILEY, R. Effects of density and perch availability on the immune status of broilers. **Poultry Science**, v. 81, n. 4, p. 451–457, 2002.

HELMBOLDT, C. F.; BRYANT, E. S. The pathology of necrotic enteritis in domestic fowl. **Avian Diseases**, v. 15, p. 775–780, 1971.

HENDRICKS III, G. L.; SIEGEL, H. S.; MASHALY, M. M. Ovine corticotropin-releasing factor increases endocrine and immunologic activity of avian leukocytes in vitro. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 196, n. 4, p. 390–395, 1991.

HENDRICKS, G. L.; MASHALY, M. M. Effects of corticotropin releasing factor on the production of adrenocorticotrophic hormone by leukocyte populations. **British Poultry Science**, v. 39, n. 1, p. 123–127, 1998.

HERMAN, J. .; DOLGAS, C. .; CARLSON, S. . Ventral subiculum regulates hypothalamo–pituitary–adrenocortical and behavioural responses to cognitive stressors. **Neuroscience**, v. 86, n. 2, p. 449–459, 1998.

HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends in Neurosciences**, v. 20, n. 2, p. 78–84, 1997.

HESS, L. Corticosteroid synthesis and metabolism in birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v. 11, n. 2, p. 65–70, 2002.

HILLHOUSE, E. W.; GRAMMATOPOULOS, D. K. The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. **Endocrine Reviews**, v. 27, n. 3, p. 260–286, 2006.

HILTON, L. S.; BEAN, A. G. D.; LOWENTHAL, J. W. The emerging role of avian cytokines as immunotherapeutics and vaccine adjuvants. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 85, n. 3-4, p. 119–128, 2002.

HIROTA, K.; YOSHITOMI, H.; HASHIMOTO, M.; MAEDA, S.; TERADAIRA, S.; SUGIMOTO, N.; YAMAGUCHI, T.; NOMURA, T.; ITO, H.; NAKAMURA, T.; SAKAGUCHI, N.; SAKAGUCHI, S. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 12, p. 2803–2812, 2007.

HÖLZER, H. H.; TURKELSON, C. M.; SOLOMON, T. E.; RAYBOULD, H. E. Intestinal lipid inhibits gastric emptying via CCK and a vagal capsaicin-sensitive afferent pathway in rats. **The American Journal of Physiology**, v. 267, n. 4 Pt 1, p. G625–629, 1994.

HOLZER, P. Sensory neurone responses to mucosal noxae in the upper gut: relevance to mucosal integrity and gastrointestinal pain. **Neurogastroenterology and Motility**: the official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society, v. 14, n. 5, p. 459–475, 2002.

HONDA, B. T. B.; CALEFI, A. S.; COSTOLA-DE-SOUZA, C.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; DA SILVA FONSECA, J. G.; DE PAULA, V. F.; PALERMO-NETO, J. Effects of heat stress on peripheral T and B lymphocyte profiles and IgG and IgM serum levels in broiler chickens vaccinated for Newcastle disease virus. **Poultry Science**, v. 94, n. 10, p. 2375–2381, 2015.

HONG, Y. H.; LILLEHOJ, H. S.; LEE, S. H.; DALLOUL, R. A.; LILLEHOJ, E. P. Analysis of chicken cytokine and chemokine gene expression following *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 114, n. 3-4, p. 209–223, 2006a.

HONG, Y. H.; LILLEHOJ, H. S.; LEE, S. H.; PARK, D. W.; LILLEHOJ, E. P. Molecular cloning and characterization of chicken lipopolysaccharide-induced TNF- α factor (LITAF). **Developmental and Comparative Immunology**, v. 30, n. 10, p. 919–929, 2006b.

HONG, Y. H.; LILLEHOJ, H. S.; LILLEHOJ, E. P.; LEE, S. H. Changes in immune-related gene expression and intestinal lymphocyte subpopulations following *Eimeria maxima* infection of chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 114, n. 3-4, p. 259–272, 2006c.

HONG, Y. H.; SONG, W.; LEE, S. H.; LILLEHOJ, H. S. Differential gene expression profiles of beta-defensins in the crop, intestine, and spleen using a necrotic enteritis model in 2 commercial broiler chicken lines. **Poultry Science**, v. 91, n. 5, p. 1081–1088, 2012.

HOOK, D.; JALALUDIN, B.; FITZSIMMONS, G. Clostridium perfringens food-borne outbreak: an epidemiological investigation. **Australian and New Zealand Journal of Public Health**, v. 20, n. 2, p. 119–122, 1996.

HOSHINO, K.; TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; SANJO, H.; OGAWA, T.; TAKEDA, Y.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. **Journal of Immunology**, Baltimore, Md, v. 162, n. 7, p. 3749–3752, 1999.

HOWREN, M. B.; LAMKIN, D. M.; SULS, J. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. **Psychosomatic Medicine**, v. 71, n. 2, p. 171–186, 2009.

HU, Y.; DIETRICH, H.; HEROLD, M.; HEINRICHE, P. C.; WICK, G. Disturbed immuno-endocrine communication via the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in autoimmune disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 102, n. 3, p. 232–241, 1993.

HUMPHREY, T. Are happy chickens safer chickens? Poultry welfare and disease susceptibility. **British Poultry Science**, v. 47, n. 4, p. 379–391, 2006.

HUNTER, C. A.; BERMUDEZ, L.; BEERNINK, H.; WAEGELL, W.; REMINGTON, J. S. Transforming growth factor-beta inhibits interleukin-12-induced production of interferon-gamma by natural killer cells: a role for transforming growth factor-beta in the regulation of T cell-independent resistance to Toxoplasma gondii. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 4, p. 994–1000, 1995.

HURLEY, C. B. Clustering Visualizations of Multidimensional Data. **Journal of Computational and Graphical Statistics**, v. 13, n. 4, p. 788–806, 2004.

IMMERSEEL, F. VAN; ROOD, J. I.; MOORE, R. J.; TITBALL, R. W. Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 32–36, 2009.

IVANOV, I. I.; ATARASHI, K.; MANEL, N.; BRODIE, E. L.; SHIMA, T.; KARAOZ, U.; WEI, D.; GOLDFARB, K. C.; SANTEE, C. A.; LYNCH, S. V.; TANOUE, T.; IMAOKA, A.; ITOH, K.; TAKEDA, K.; UMESAKI, Y.; HONDA, K.; LITTMAN, D. R. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. **Cell**, v. 139, n. 3, p. 485–498, 2009.

IWAKABE, K.; SHIMADA, M.; OHTA, A.; YAHATA, T.; OHMI, Y.; HABU, S.; NISHIMURA, T. The restraint stress drives a shift in Th1/Th2 balance toward Th2-dominant immunity in mice. **Immunology Letters**, v. 62, n. 1, p. 39–43, 1998.

JEURISSEN, S. H. The role of various compartments in the chicken spleen during an antigen-specific humoral response. **Immunology**, v. 80, n. 1, p. 29–33, 1993.

JEURISSEN, S. H. M. Structure and function of the chicken spleen. **Research in Immunology**, v. 142, n. 4, p. 352–355, 1991.

JOHNSON, D. C.; PINEDO, C. Gizzard erosion and ulceration in Peru broilers. **Avian Diseases**, v. 15, n. 4, p. 835–837, 1971.

JOHNSON, J. D.; CAMPISI, J.; SHARKEY, C. M.; KENNEDY, S. L.; NICKERSON, M.; GREENWOOD, B. N.; FLESHNER, M. Catecholamines mediate stress-induced increases in peripheral and central inflammatory cytokines. **Neuroscience**, v. 135, n. 4, p. 1295–1307, 2005.

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

JOHNSON, R. W. The concept of sickness behavior: a brief chronological account of four key discoveries. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 87, n. 3-4, p. 443–450, 2002.

JOHNSON, R. W.; CURTIS, S. E.; DANTZER, R.; BAHR, J. M.; KELLEY, K. W. Sickness behavior in birds caused by peripheral or central injection of endotoxin. **Physiology & Behavior**, v. 53, n. 2, p. 343–348, 1993.

JOVANOVIC, H.; PERSKI, A.; BERGLUND, H.; SAVIC, I. Chronic stress is linked to 5-HT(1A) receptor changes and functional disintegration of the limbic networks. **NeuroImage**, v. 55, n. 3, p. 1178–1188, 2011.

KABIERSCHE, A.; DEL REY, A.; HONEGGER, C. G.; BESEDOVSKY, H. O. Interleukin-1 induces changes in norepinephrine metabolism in the rat brain. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 2, n. 3, p. 267–274, 1988.

KALDHUSDAL, M.; HOFSHAGEN, M. Barley inclusion and avoparcin supplementation in broiler diets. 2. Clinical, pathological, and bacteriological findings in a mild form of necrotic enteritis. **Poultry Science**, v. 71, n. 7, p. 1145–1153, 1992.

KALDHUSDAL, M.; HOFSHAGEN, M.; LOVLAND, A.; LANGSTRAND, H.; REDHEAD, K. Necrotic enteritis challenge models with broiler chickens raised on litter: evaluation of preconditions, *Clostridium perfringens* strains and outcome variables. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 337–343, 1999.

KAMILARIS, T. C.; DEBOLD, C. R.; JOHNSON, E. O.; MAMALAKI, E.; LISTWAK, S. J.; CALOGERO, A. E.; KALOGERAS, C. T.; GOLD, P. W.; ORTH, D. N. Effects of short and long duration hypothyroidism and hyperthyroidism on the plasma adrenocorticotropin and corticosterone responses to ovine corticotropin-releasing hormone in rats. **Endocrinology**, v. 128, n. 5, p. 2567–2576, 1991.

KASPERS, B.; LILLEHOJ, H. S.; JENKINS, M. C.; PHARR, G. T. Chicken interferon-mediated induction of major histocompatibility complex Class II antigens on peripheral blood monocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 44, n. 1, p. 71–84, 1994.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, p. 373–384, 2010.

KELLERMANN, S. A.; HUDAK, S.; OLDHAM, E. R.; LIU, Y. J.; MCEVOY, L. M. The CC chemokine receptor-7 ligands 6Ckine and macrophage inflammatory protein-3 beta are potent chemoattractants for in vitro- and in vivo-derived dendritic cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, Md, v. 162, n. 7, p. 3859–3864, 1999.

KELLER-WOOD, M. E.; DALLMAN, M. F. Corticosteroid Inhibition of ACTH Secretion. **Endocrine Reviews**, v. 5, n. 1, p. 1–24, 1984.

KELLEY, K. W.; BLUTHÉ, R.-M.; DANTZER, R.; ZHOU, J.-H.; SHEN, W.-H.; JOHNSON, R. W.; BROUSSARD, S. R. Cytokine-induced sickness behavior. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 17, p. S112–118, 2003. Supplement, 1.

KENNETT, G. A.; DICKINSON, S. L.; CURZON, G. Enhancement of some 5-HT-dependent behavioural responses following repeated immobilization in rats. **Brain Research**, v. 330, n. 2, p. 253–263, 1985.

KISHI, T.; TSUMORI, T.; ONO, K.; YOKOTA, S.; ISHINO, H.; YASUI, Y. Topographical organization of projections from the subiculum to the hypothalamus in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 419, n. 2, p. 205–222, 2000.

KLUKOWSKI, L. A.; CAWTHORN, J. M.; KETTERSON, E. D.; NOLAN JR., V. Effects of experimentally elevated testosterone on plasma Corticosterone and corticosteroid-binding globulin in dark-eyed juncos (*Junco hyemalis*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 108, n. 1, p. 141–151, 1997.

KOMANO, H.; FUJIURA, Y.; KAWAGUCHI, M.; MATSUMOTO, S.; HASHIMOTO, Y.; OBANA, S.; MOMBAERTS, P.; TONEGAWA, S.; YAMAMOTO, H.; ITOHARA, S. Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial gamma delta T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 13, p. 6147–6151, 1995.

KONDO, M.; TAMAOKI, J.; TAKEYAMA, K.; NAKATA, J.; NAGAI, A. Interleukin-13 induces goblet cell differentiation in primary cell culture from Guinea pig tracheal epithelium. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 27, n. 5, p. 536–541, 2002.

KONG, F.; CHEN, C. H.; COOPER, M. D. Thymic function can be accurately monitored by the level of recent T cell emigrants in the circulation. **Immunity**, v. 8, n. 1, p. 97–104, 1998.

KUENZEL, W. Dual hypothalamic feeding system in a migratory bird, *Zonotrichia albicollis*. **American Journal of Physiology - Legacy Content**, v. 223, n. 5, p.

1138–1142, 1972.

KUENZEL, W. J. Central neuroanatomical systems involved in the regulation of food intake in birds and mammals. **The Journal of Nutrition**, v. 124, n. 8 Suppl, p. 1355S–1370S, 1994.

LAMBERT, G. P. Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 14 Suppl, p. E101–8, 2009.

LAMBERT, G. P.; GISOLFI, C. V; BERG, D. J.; MOSELEY, P. L.; OBERLEY, L. W.; KREGEL, K. C. Selected contribution: hyperthermia-induced intestinal permeability and the role of oxidative and nitrosative stress. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 4, p. 1750–61; 2002.

LARA, L. J.; ROSTAGNO, M. H. Impact of Heat Stress on Poultry Production. **Animals : An Open Access Journal from MDPI**, v. 3, n. 2, p. 356–369, 2013.

LARSON, S. J.; DUNN, A J. Behavioral effects of cytokines. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 15, n. 4, p. 371–387, 2001.

LAWRENCE, E. C.; ARNAUD-BATTANDIER, F.; GRAYSON, J.; KOSKI, I. R.; DOOLEY, N. J.; MUCHMORE, A. V; BLAESE, R. M. Ontogeny of humoral immune function in normal chickens: a comparison of immunoglobulin-secreting cells in bone marrow, spleen, lungs and intestine. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 43, n. 3, p. 450–457, 1981.

LAZAREVIC, V.; GLIMCHER, L. H.; LORD, G. M. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. **Nature Reviews. Immunology**, v. 13, n. 11, p. 777–789, 2013.

LEBLOIS, A.; WENDEL, B. J.; PERKEL, D. J. Striatal dopamine modulates basal ganglia output and regulates social context-dependent behavioral variability through D1 receptors. **The Journal of Neuroscience: the official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 16, p. 5730–5743, 2010.

LEE, K. W.; LILLEHOJ, H. S.; JEONG, W.; JEOUNG, H. Y.; AN, D. J. Avian necrotic enteritis: experimental models, host immunity, pathogenesis, risk factors, and vaccine development. **Poultry Science**, v. 90, n. 7, p. 1381–1390, 2011.

LI, Y.; CAI, H. Y.; LIU, G. H.; DONG, X. L.; CHANG, W. H.; ZHANG, S.; ZHENG, A. J.; CHEN, G. L. Effects of stress simulated by dexamethasone on jejunal glucose transport in broilers. **Poultry Science**, v. 88, n. 2, p. 330–337, 2009.

LICINIO, J.; FROST, P. The neuroimmune-endocrine axis: pathophysiological implications for the central nervous system cytokines and hypothalamus-pituitary-adrenal hormone dynamics. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 10, p. 1141–1148, 2000.

LILLEHOJ, H.; BACON, L. Increase of intestinal intraepithelial lymphocytes expressing CD8 antigen following challenge infection with *Eimeria acervulina*. **Avian**

Diseases, v. 35, n. 2, p. 294-301, 1991.

LILLEHOJ, H.; OKAMURA, M. Host immunity and vaccine development to coccidia and Salmonella infections in chickens. **The Journal of Poultry Science**, v. 40, n. 3, p. 151–193, 2003.

LILLEHOJ, H. S.; MIN, W.; DALLOUL, R. A. Recent progress on the cytokine regulation of intestinal immune responses to Eimeria. **Poultry Science**, v. 83, n. 4, p. 611–623, 2004.

LIU, Y.-J.; ARPIN, C. Germinal center development. **Immunological Reviews**, v. 156, n. 1, p. 111–126, 1997.

LONG, J. R. Necrotic enteritis in broiler chickens. I. A review of the literature and the prevalence of the disease in Ontario. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 37, n. 3, p. 302–308, 1973.

LONG, J. R.; PETTIT, J. R.; BARNUM, D. A. Necrotic enteritis in broiler chickens. II. Pathology and proposed pathogenesis. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 38, n. 4, p. 467–474, 1974.

LORTON, D.; BELLINGER, D.; DUCLOS, M.; FELTEN, S. Y.; FELTEN, D. L. Application of 6-hydroxydopamine into the fatpads surrounding the draining lymph nodes exacerbates adjuvant-induced arthritis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 64, n. 2, p. 103–113, 1996.

LOVLAND, A.; KALDHUSDAL, M. Severely impaired production performance in broiler flocks with high incidence of Clostridium perfringens-associated hepatitis. **Avian Pathology**, v. 30, n. 1, p. 73–81, 2001.

LOVLAND, A.; KALDHUSDAL, M.; REDHEAD, K.; SKJERVE, E.; LILLEHAUG, A. Maternal vaccination against subclinical necrotic enteritis in broilers. **Avian Pathology** : journal of the W.V.P.A, v. 33, n. 1, p. 83–92, 2004.

LU, Y.; SARSON, A. J.; GONG, J.; ZHOU, H.; ZHU, W.; KANG, Z.; YU, H.; SHARIF, S.; HAN, Y. Expression profiles of genes in Toll-like receptor-mediated signaling of broilers infected with Clostridium perfringens. **Clinical and Vaccine Immunology** : CVI, v. 16, n. 11, p. 1639–1647, 2009.

LUKAS, N. W.; MCCORKLE, F. M.; TAYLOR JR., R. L. Monoamines suppress the phytohemagglutinin wattle response in chickens. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 11, n. 4, p. 759–768, 1987.

LUTGENDORFF, F.; AKKERMANS, L. M. A.; SÖDERHOLM, J. D. The role of microbiota and probiotics in stress-induced gastro-intestinal damage. **Current Molecular Medicine**, v. 8, n. 4, p. 282–298, 2008.

MACLENNAN, I. C. M. Germinal centers. **Annual Review of Immunology**, v. 12, n. 1, p. 117-139, 2003.

MALISCH, J. L.; BREUNER, C. W. Steroid-binding proteins and free steroids in birds. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 316, n. 1, p. 42–52, 2010.

MARSH, J. A.; GAUSE, W. C.; SANDHU, S.; SCANES, C. G. Enhanced growth and immune development in dwarf chickens treated with mammalian growth hormone and thyroxine. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 3, n. 175, p. 351–360, 1984.

MARSH, J. A.; LAUTERIO, T. J.; SCANES, C. G. Effects of triiodothyronine treatments on body and organ growth and the development of immune function in dwarf chickens. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 1, n. 177, p. 82–91, 1984.

MARSH, J. A.; SCANES, C. G. Neuroendocrine-immune interactions. **Poultry Science**, v. 73, n. 7, p. 1049–1061, 1994.

MASHALY, M. M.; HENDRICKS 3RD, G. L.; KALAMA, M. A.; GEHAD, A. E.; ABBAS, A. O.; PATTERSON, P. H. Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. **Poultry Science**, v. 83, n. 6, p. 889–894, 2004.

MASHALY, M. M.; TROUT, J. M.; HENDRICKS 3RD., G. L. The endocrine function of the immune cells in the initiation of humoral immunity. **Poultry Science**, v. 72, n. 7, p. 1289–1293, 1993.

MASHALY, M. M.; TROUT, J. M.; HENDRICKS III, G.; AL-DOKHI, L. M.; GEHAD, A. The role of neuroendocrine immune interactions in the initiation of humoral immunity in chickens. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 409–422, 1998.

MASON, J. W. A historical view of the stress field. **Journal of Human Stress**, v. 1, n. 2, p. 22–36, 1975.

MCCLANE, B. A.; CHAKRABARTI, G. New insights into the cytotoxic mechanisms of *Clostridium perfringens* enterotoxin. **Anaerobe**, v. 10, n. 2, p. 107–114, 2004.

MCCORKLE, F. M.; TAYLOR JR., R. L. Continuous administration of dopamine alters cellular immunity in chickens. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology**, v. 109, n. 3, p. 289–293, 1994.

MCCORKLE, F. M.; TAYLOR JR., R. L.; DENNO, K. M.; JABE, J. M. Monoamines alter in vitro migration of chicken leukocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 14, n. 1, p. 85–93, 1990.

MCCRACKEN, V. J.; LORENZ, R. G. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. Microreview. **Cellular Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 1–11, 2001.

MCEWEN, B. S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Research**, v. 886, n. 1-2, p. 172–189, 2000.

MCFARLANE, J. M.; CURTIS, S. E. Multiple concurrent stressors in chicks.: 3. effects on plasma corticosterone and the heterophil:lymphocyte ratio. **Poultry Science**, v. 68, n. 4, p. 522–527, 1989.

MCFARLANE, J. M.; CURTIS, S. E.; SHANKS, R. D.; CARMER, S. G. Multiple concurrent stressors in chicks. 1. Effect on weight gain, feed intake, and behavior. **Poultry Science**, v. 68, n. 4, p. 501–509, 1989.

MCILROY, P. J.; KOCSIS, J. F.; WEBER, H.; CARSIA, R. V. Dietary protein restriction stress in the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*) alters adrenocorticotropin-transmembranous signaling and corticosterone negative feedback in adrenal steroidogenic cells. **General and Comparative Endocrinology**, v. 113, n. 2, p. 255–266, 1999.

MCREYNOLDS, J. L.; BYRD, J. A.; ANDERSON, R. C.; MOORE, R. W.; EDRINGTON, T. S.; GENOVESE, K. J.; POOLE, T. L.; KUBENA, L. F.; NISBET, D. J. Evaluation of immunosuppressants and dietary mechanisms in an experimental disease model for necrotic enteritis. **Poultry Science**, v. 83, n. 12, p. 1948–1952, 2004.

MILLER, A. H. Neuroendocrine and immune system interactions in stress and depression. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 21, n. 2, p. 443–463, 1998.

MILLER, A. H. Cytokines and sickness behavior: implications for cancer care and control. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 17, p. S132–134, 2003. Supplement, 1.

MIN, W.; LILLEHOJ, H. S.; BURNSIDE, J.; WEINING, K. C.; STAEHELI, P.; ZHU, J. J. Adjuvant effects of IL-1 β , IL-2, IL-8, IL-15, IFN- α , IFN- γ TGF- β 4 and lymphotactin on DNA vaccination against *Eimeria acervulina*. **Vaccine**, v. 20, n. 1-2, p. 267–274, 2001.

MINTON, J. E. Function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the sympathetic nervous system in models of acute stress in domestic farm animals. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 7, p. 1891–1898, 1994.

MITCHELL, M. A.; KETTLEWELL, P. J. Physiological stress and welfare of broiler chickens in transit: solutions not problems! **Poultry Science**, v. 77, n. 12, p. 1803–1814, 1998.

MIWA, N.; NISHINA, T.; KUBO, S.; ATSUMI, M.; HONDA, H. Amount of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat detected by nested PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 195–200, 1998.

MORGAN, W. W.; KEVIN RUDEEN, P.; PFEIL, K. A. Effect of immobilization stress on serotonin content and turnover in regions of the rat brain. **Life Sciences**, v. 17, n. 1, p. 143–150, 1975.

MORIMOTO, R. I.; SANTORO, M. G. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. **Nature Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 833–838, 1998.

MOTOBU, M.; EL-ABASY, M.; NA, K.-J.; VAINIO, O.; TOIVANEN, P.; HIROTA, Y. Effects of 6-hydroxydopamine on the development of the immune system in chickens. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 65, n. 1, p. 35–42, 2003.

NAIRN, M. E.; BAMFORD, V. W. Necrotic enteritis of broiler chickens in western Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 43, n. 2, p. 49–54, 1967.

NANCE, D. M.; SANDERS, V. M. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). **Brain, Behavior and Immunity**, v. 21, n. 6, p. 736–745, 2007.

NATHAN, C. F.; ROOT, R. K. Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages: dependence on sequential activation and triggering. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 146, n. 6, p. 1648–1662, 1977.

OLIVER, S. R.; PHILLIPS, N. A.; NOVOSAD, V. L.; BAKOS, M. P.; TALBERT, E. E.; CLANTON, T. L. Hyperthermia induces injury to the intestinal mucosa in the mouse: evidence for an oxidative stress mechanism. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, n. 7, p. R845-R853, 2012.

ONO, T. [Effects of mesocortical dopaminergic lesions on stress-induced changes in monoamine metabolism in the discrete brain regions of rats]. **Yakubutsu, Seishin, Kōdō = Japanese Journal of Psychopharmacology**, v. 12, n. 2, p. 93–103, 1992.

PACAK, K.; PALKOVITS, M.; KOPIN, I. J.; GOLDSTEIN, D. S. Stress-induced norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity: in vivo microdialysis studies. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 16, n. 2, p. 89–150, 1995.

PALERMO NETO, J.; MASSOCO, C. O.; FAVARE, R. C. Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 23, n. 5, p. 497–507, 2001.

PALERMO-NETO, J. Dopaminergic systems. Dopamine receptors. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 20, n. 4, p. 705–721, 1997.

PARDON, M.-C.; MA, S.; MORILAK, D. A. Chronic cold stress sensitizes brain noradrenergic reactivity and noradrenergic facilitation of the HPA stress response in Wistar Kyoto rats. **Brain Research**, v. 971, n. 1, p. 55–65, 2003.

PARISH, W. E. Necrotic enteritis in the fowl (*Gallus gallus domesticus*). I. Histopathology of the disease and isolation of a strain of *Clostridium welchii*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 71, p. 377–393, 1961a.

PARISH, W. E. Necrotic enteritis in the fowl. II. examination of the causal *Clostridium welchii*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 71, p. 394–404, 1961b.

PARISH, W. E. Necrotic enteritis in the fowl. III. The experimental disease. **Journal**

of **Comparative Pathology**, v. 71, p. 405–413, 1961c.

PARK, J.; KIM, M.; NA, G.; JEON, I.; KWON, Y.; KIM, J.; YOUN, H.; KOO, Y. Glucocorticoids modulate NF-kappaB-dependent gene expression by up-regulating FKBP51 expression in Newcastle disease virus-infected chickens. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 278, n. 1-2, p. 7–17, 2007.

PARK, S. S.; LILLEHOJ, H. S.; ALLEN, P. C.; PARK, D. W.; FITZCOY, S.; BAUTISTA, D. A.; LILLEHOJE, E. P. Immunopathology and cytokine responses in broiler chickens coinfectd with *Eimeria maxima* and *Clostridium perfringens* with the use of an animal model of necrotic enteritis. **Avian Diseases**, v. 52, n. 1, p. 14–22, 2008.

PASARE, C.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 560, p. 11–18, 2005.

PINTEA, V.; CONSTANTINESCU, G. M.; RADU, C. Vascular and nervous supply of bursa of fabricius in the hen. **Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 17, n. 3, p. 263–268, 1967.

POON, D. C.-H.; HO, Y.-S.; CHIU, K.; CHANG, R. C.-C. Cytokines: how important are they in mediating sickness? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 1, p. 1–10, 2013.

POST, J.; REBEL, J. M.; TER HUURNE, A. A. Physiological effects of elevated plasma corticosterone concentrations in broiler chickens. An alternative means by which to assess the physiological effects of stress. **Poultry Science**, v. 82, n. 8, p. 1313–1318, 2003.

POZZI, L.-A. M.; MACIASZEK, J. W.; ROCK, K. L. Both dendritic cells and macrophages can stimulate naive CD8 T cells in vivo to proliferate, develop effector function, and differentiate into memory cells. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 4, p. 2071–2081, 2005.

QUINTEIRO-FILHO, W. M.; RIGHI, D. A.; PALERMO-NETO, J. Effect of cyhalothrin on Ehrlich tumor growth and macrophage activity in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 10, p. 912–917, 2009.

QUINTEIRO-FILHO, W. M.; RIBEIRO, A.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; PINHEIRO, M. L.; SAKAI, M.; SA, L. R.; FERREIRA, A. J.; PALERMO-NETO, J. Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 89, n. 9, p. 1905–1914, 2010.

QUINTEIRO-FILHO, W. M.; GOMES, A. V. S.; PINHEIRO, M. L.; RIBEIRO, A.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; FERREIRA, A. J. P.; PALERMO-NETO, J. Heat stress impairs performance and induces intestinal inflammation in broiler chickens infected with *Salmonella enteritidis*. **Avian Pathology** : journal of the W.V.P.A, v. 41, n. 5, p. 421–427, 2012a.

QUINTEIRO-FILHO, W. M.; RODRIGUES, M. V.; RIBEIRO, A.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; PINHEIRO, M. L.; SA, L. R.; FERREIRA, A. J.; PALERMO-NETO, J. Acute heat stress impairs performance parameters and induces mild intestinal enteritis in broiler chickens: role of acute HPA axis activation. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 6, p. 1986-1994, 2012b.

QURESHI, M. A.; BLOOM, S. E.; DIETERT, R. R. Effects of Increased Major Histocompatibility Complex Dosage on Chicken Monocyte-Macrophage Function. **Experimental Biology and Medicine**, v. 190, n. 2, p. 195–202, 1989.

RICHARD, D.; LIN, Q.; TIMOFEEVA, E. The corticotropin-releasing factor family of peptides and CRF receptors: their roles in the regulation of energy balance. **European Journal of Pharmacology**, v. 440, n. 2-3, p. 189–197, 2002.

RIDDELL, C.; KONG, X. M. The influence of diet on necrotic enteritis in broiler chickens. **Avian Diseases**, v. 36, n. 3, p. 499–503, 1992.

RINCÓN, M.; ANGUITA, J.; NAKAMURA, T.; FIKRIG, E.; FLAVELL, R. A. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4⁺ T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 3, p. 461–469, 1997.

RINCÓN, M.; FLAVELL, R. A. Transcriptional control in the Th1/Th2 decision. **Current Biology**, v. 7, n. 11, p. R729–R732, 1997.

RISOLD, P. Y.; SWANSON, L. W. Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus. **Science**, v. 272, n. 5267, p. 1484–1486, 1996.

ROBERTS, W. W.; MARTIN, J. R. Peripheral thermoreceptor control of thermoregulatory responses of the rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 87, v. 6, p. 1109, 1974.

ROBINSON, P.; OKHUYSEN, P. C.; CHAPPELL, C. L.; LEWIS, D. E.; SHAHAB, I.; LAHOTI, S.; WHITE, A. C. Transforming growth factor beta1 is expressed in the jejunum after experimental *Cryptosporidium parvum* infection in humans. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 9, p. 5405–5407, 2000.

ROBINZON, B.; KATZ, Y. The effects of hypothalamic and mesencephalic lesions on food and water intakes, adiposity and some endocrine criteria, in the red-winged blackbird (*Agelaius phoeniceus*). **Physiology & Behavior**, v. 24, n. 2, p. 347–356, 1980.

ROLAND, B. L.; SAWCHENKO, P. E. Local origins of some GABAergic projections to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 332, n. 1, p. 123–143, 1993.

ROMPPANEN, T. A morphometrical method for analyzing germinal centers in the chicken spleen. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section C Immunology**, v. 89C, n. 1-6, p. 263–268, 1981.

ROMPPANEN, T.; SORVARI, T. E. A Morphometrical study of chicken spleen with

special reference to the Bursa dependence of the white pulp. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 65, n. 3, p. 349–358, 1981.

ROOD, J. I. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. **Annual Review of Microbiology**, v. 52, p. 333–360, 1998.

ROSE, M. E.; ORLANS, E.; PAYNE, A. W.; HESKETH, P. The origin of IgA in chicken bile: its rapid active transport from blood. **European Journal of Immunology**, v. 11, n. 7, p. 561–564, 1981.

ROZENBOIM, I.; TAKO, E.; GAL-GARBER, O.; PROUDMAN, J. A.; UNI, Z. The effect of heat stress on ovarian function of laying hens. **Poultry Science**, v. 86, n. 8, p. 1760–1765, 2007.

SANCHEZ-SANCHEZ, N.; RIOL-BLANCO, L.; RODRIGUEZ-FERNANDEZ, J. L. The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 9, p. 5153–5159, 2006.

SCHIEHMANN, D. A. Laboratory confirmation of an outbreak of *Clostridium perfringens* food poisoning. **Health Laboratory Science**, v. 14, n. 1, p. 35–38, 1977.

SCHROTT, L. M.; GETTY, M. E.; WACNIK, P. W.; SPARBER, S. B. Open-field and LPS-induced sickness behavior in young chickens: effects of embryonic cocaine and/or ritanserin. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 61, n. 1, p. 9–17, 1998.

SCHWICKERT, T. A.; LINDQUIST, R. L.; SHAKHAR, G.; LIVSHITS, G.; SKOKOS, D.; KOSCO-VILBOIS, M. H.; DUSTIN, M. L.; NUSSENZWEIG, M. C. In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure. **Nature**, v. 446, n. 7131, p. 83–87, 2007.

SEGAL, B. H.; KUHNS, D. B.; DING, L.; GALLIN, J. I.; HOLLAND, S. M. Thioglycollate peritonitis in mice lacking C5, 5-lipoxygenase, or p47phox: complement, leukotrienes, and reactive oxidants in acute inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 71, n. 3, p. 410–416, 2002.

SELVARAJ, R. K. Avian CD4(+)CD25(+) regulatory T cells: properties and therapeutic applications. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 41, n. 3, p. 397–402, 2013.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse noxious agents. **Nature**, v. 138, n. 3479, p. 32, 1936.

SELYE, H. Stress and disease. **Science**, v. 122, p. 625–631, 1955.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse noxious agents. 1936. **The Journal of Neuropsychiatry & Clinical Neurosciences**, v. 10, n. 2, p. 230–231, 1998.

SHANE, S. M. Re-emergence of necrotic enteritis in the broiler industry. **International Journal of Poultry Science**, v. 4, n. 9, p. 604–611, 2005.

SHANE, S. M.; GYIMAH, J. E.; HARRINGTON, K. S.; SNIDER 3RD, T. G. Etiology and pathogenesis of necrotic enteritis. **Veterinary Research Communications**, v. 9, n. 4, p. 269–287, 1985.

SHANMUGASUNDARAM, R.; SELVARAJ, R. K. Regulatory T cell properties of chicken CD4+CD25+ cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, Md., v. 186, n. 4, p. 1997–2002, 2011.

SHARKEY, K. A.; MAWE, G. M. Neuroimmune and epithelial interactions in intestinal inflammation. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, n. 6, p. 669–677, 2002.

SHIMIZU, T. [Analysis of genomic structure and regulation of virulence genes of *Clostridium perfringens*]. **Nihon Saikingaku Zasshi**, v. 59, n. 2, p. 377–385, 2004.

SHINI, S.; HUFF, G. R.; SHINI, A.; KAISER, P. Understanding stress-induced immunosuppression: exploration of cytokine and chemokine gene profiles in chicken peripheral leukocytes. **Poultry Science**, v. 89, n. 4, p. 841–851, 2010.

SHINI, S.; KAISER, P. Effects of stress, mimicked by administration of corticosterone in drinking water, on the expression of chicken cytokine and chemokine genes in lymphocytes. **Stress**, v. 12, n. 5, p. 388–399, 2008.

SHINI, S.; KAISER, P.; SHINI, A.; BRYDEN, W. L. Biological response of chickens (*Gallus gallus domesticus*) induced by corticosterone and a bacterial endotoxin. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: biochemistry and Molecular Biology**, v. 149, n. 2, p. 324–333, 2008.

SHOJADOOST, B.; VINCE, A. R.; PRESCOTT, J. F. The successful experimental induction of necrotic enteritis in chickens by *Clostridium perfringens*: a critical review. **Veterinary Research**, v. 43, n. 1, p. 1–12, 2012.

SIEGEL, H. S. Physiological Stress in Birds. **BioScience**, v. 30, n. 8, p. 529–534, 1980.

SILVERIN, B. Corticosterone-binding proteins and behavioral effects of high plasma levels of corticosterone during the breeding period in the pied flycatcher. **General and Comparative Endocrinology**, v. 64, n. 1, p. 67–74, 1986.

SIMON, E. Effects of CNS temperature on generation and transmission of temperature signals in homeotherms a common concept for mammalian and avian thermoregulation. **Archiv European Journal of Physiology**, v. 392, n. 1, p. 79–88, 1981.

SINGH, K. M.; SHAH, T.; DESHPANDE, S.; JAKHESARA, S. J.; KORINGA, P. G.; RANK, D. N.; JOSHI, C. G. High through put 16S rRNA gene-based pyrosequencing analysis of the fecal microbiota of high FCR and low FCR broiler growers. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 12, p. 10595–10602, 2012.

SKINNER, J. T.; BAUER, S.; YOUNG, V.; PAULING, G.; WILSON, J. An Economic

Analysis of the impact of subclinical (mild) necrotic enteritis in broiler chickens. **Avian Diseases**, v. 54, n. 4, p. 1237-1240, 2010.

SKIRROW, M. B. Epidemiology of Campylobacter enteritis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 9–16, 1991.

SKWARLO-SONTA, K. Prolactin as an immunoregulatory hormone in mammals and birds. **Immunology Letters**, v. 33, n. 2, p. 105–121, 1992.

SLUIS, W. VAN DER. Clostridial enteritis – a syndrome emerging world wide. **World Poultry**, v. 16, n. 5, p. 56–57, 2000.

SOLEIMANI, A F.; ZULKIFLI, I.; OMAR, A R.; RAHA, A R. Physiological responses of 3 chicken breeds to acute heat stress. **Poultry Science**, v. 90, n. 7, p. 1435–1440, 2011.

SOWDER, J. T. A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor. **Journal of Experimental Medicine**, v. 167, n. 2, p. 315–322, 1988.

STAR, L.; NIEUWLAND, M. G.; KEMP, B.; PARMENTIER, H. K. Effect of single or combined climatic and hygienic stress on natural and specific humoral immune competence in four layer lines. **Poultry Science**, v. 86, n. 9, p. 1894–1903, 2007.

ST-PIERRE, N. R.; COBANOV, B.; SCHNITKEY, G. Economic losses from heat stress by US livestock industries. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. E52–E77, 2003.

STREET, N.; MOSMANN, T. Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. **The FASEB Journal**, v. 5, n. 2, p. 171–177, 1991.

SULLIVAN, R. M.; DUFRESNE, M. M. Mesocortical dopamine and HPA axis regulation: role of laterality and early environment. **Brain Research**, v. 1076, n. 1, p. 49–59, 2006.

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. Circulação sanguínea e sistema cardiovascular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. v. 11.

SZAFARCZYK, A.; MALAVAL, F.; LAURENT, A.; GIBAUD, R.; ASSENMACHER, I. Further evidence for a central stimulatory action of catecholamines on a adrenocorticotropin release in the rat. **Endocrinology**, v. 121, n. 3, p. 883–892, 1987.

TAKEUCHI, O.; HOSHINO, K.; AKIRA, S. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to Staphylococcus aureus infection. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 10, p. 5392–5396, 2000.

TENG, Q.-Y.; ZHOU, J.-Y.; WU, J.-J.; GUO, J.-Q.; SHEN, H.-G. Characterization of chicken interleukin 2 receptor alpha chain, a homolog to mammalian CD25. **FEBS**

Letters, v. 580, n. 17, p. 4274–4281, 2006.

THOMPSON, D. R.; PARREIRA, V. R.; KULKARNI, R. R.; PRESCOTT, J. F. Live attenuated vaccine-based control of necrotic enteritis of broiler chickens. **Veterinary Microbiology**, v. 113, n. 1-2, p. 25–34, 2006.

TIMBERMONTA, L.; HAESEBROUCKA, F.; DUCATELLEA, R.; IMMERSEEL, F. VAN. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. **Avian Pathology**, v. 40, n. 4, p. 341–347, 2011.

TREGASKES, C. A.; KONG, F. K.; PARAMITHIOTIS, E.; CHEN, C. L.; RATCLIFFE, M. J.; DAVISON, T. F.; YOUNG, J. R. Identification and analysis of the expression of CD8 alpha beta and CD8 alpha alpha isoforms in chickens reveals a major TCR-gamma delta CD8 alpha beta subset of intestinal intraepithelial lymphocytes. **Journal of Immunology**, Baltimore, Md., v. 154, n. 9, p. 4485–4494, 1995.

TROUT, J. M.; LILLEHOJ, H. S. Eimeria acervulina infection: evidence for the involvement of CD8+ T lymphocytes in sporozoite transport and host protection. **Poultry Science**, v. 74, n. 7, p. 1117–1125, 1995.

TROUT, J. M.; MASHALY, M. M. The effects of adrenocorticotrophic hormone and heat stress on the distribution of lymphocyte populations in immature male chickens. **Poultry Science**, v. 73, n. 11, p. 1694–1698, 1994.

TROUT, J. M.; MASHALY, M. M. Effects of in vitro corticosterone on chicken T- and B-lymphocyte proliferation. **British Poultry Science**, v. 36, n. 5, p. 813–820, 1995.

TRUSCOTT, R. B.; AL-SHEIKHLY, F. Reproduction and treatment of necrotic enteritis in broilers. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 6, p. 857–861, 1977.

TSAI, S. S.; TUNG, M. C. An outbreak of necrotic enteritis in broiler chickens. **Journal of the Chinese Society of Veterinary Science**, v. 7, p. 13–17, 1981.

TSIOURIS, V.; GEORGOPOULOU, I.; BATZIOS, C.; PAPPAIOANNOU, N.; DUCATELLE, R.; FORTOMARIS, P. The effect of cold stress on the pathogenesis of necrotic enteritis in broiler chicks. **Avian Pathology**, v. 44, n. 6, p. 430–435, 2015a.

TSIOURIS, V.; GEORGOPOULOU, I.; BATZIOS, C.; PAPPAIOANNOU, N.; DUCATELLE, R.; FORTOMARIS, P. High stocking density as a predisposing factor for necrotic enteritis in broiler chicks. **Avian Pathology**, v. 44, n. 2, p. 59–66, 2015b.

TURNBULL, A. V.; RIVIER, C. Regulation of the HPA axis by cytokines. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 9, n. 4, p. 253–275, 1995.

UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A.; HAJJAR, A. M.; STEVENS, A.; WILSON, C. B.; BASSETTI, M.; ADEREM, A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. **Nature**, v. 401, n. 6755, p. 811–815, 1999.

UNI, Z.; PLATIN, R.; SKLAN, D. Cell proliferation in chicken intestinal epithelium occurs both in the crypt and along the villus. **Journal of Comparative Physiology B: biochemical, systemic, and environmental physiology**, v. 168, n. 4, p. 241–247, 1998.

UNSOELD, H.; VOEHRINGER, D.; KRAUTWALD, S.; PIRCHER, H. Constitutive expression of CCR7 directs effector CD8 T cells into the splenic white pulp and impairs functional activity. **Journal of Immunology**, Baltimore, Md., v. 173, n. 5, p. 3013–3019, 2004.

VAN BUUL-OFFERS, S. C.; KOOIJMAN, R. The role of growth hormone and insulin-like growth factors in the immune system. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v. 54, n. 10, p. 1083–1094, 1998.

VAN HORNE, P. L. M.; ACHTERBOSCH, T. J. Animal welfare in poultry production systems: impact of EU standards on world trade. **World's Poultry Science Journal**, v. 64, n. 01, p. 40–52, 2008.

VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; PASMANS, F.; HUYGHEBAERT, G.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Clostridium perfringens in poultry: an emerging threat for animal and public health. **Avian Pathology**, v. 33, n. 6, p. 537–549, 2004.

VANDENBORNE, K.; DE GROEF, B.; GEELISSEN, S. M. E.; KÜHN, E. R.; DARRAS, V. M.; VAN DER GEYTEN, S. Corticosterone-induced negative feedback mechanisms within the hypothalamo-pituitary-adrenal axis of the chicken. **The Journal of Endocrinology**, v. 185, n. 3, p. 383–391, 2005.

VERBRUGGHE, E.; BOYEN, F.; GAASTRA, W.; BEKHUIS, L.; LEYMAN, B.; VAN PARYS, A.; HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F. The complex interplay between stress and bacterial infections in animals. **Veterinary Microbiology**, v. 155, n. 2-4, p. 115–127, 2012.

VERMEULEN, A.; SCHAAP, D.; SCHETTERS, T. P. Control of coccidiosis in chickens by vaccination. **Veterinary Parasitology**, v. 100, n. 1-2, p. 13–20, 2001.

WALKDEN-BROWN, S. W.; ISLAM, A.; ISLAM, A. F. M. F.; BURGESS, S. K.; GROVES, P. J.; COOKE, J. Pathotyping of Australian isolates of Marek's disease virus in commercial broiler chickens vaccinated with herpesvirus of turkeys (HVT) or bivalent (HVT/SB1) vaccine and association with viral load in the spleen and feather dander. **Australian Veterinary Journal**, v. 91, n. 8, p. 341–350, 2013.

WANG, C.; KANG, S. G.; LEE, J.; SUN, Z.; KIM, C. H. The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. **Mucosal Immunology**, v. 2, n. 2, p. 173–183, 2009.

WENINK, M. H.; SANTEGOETS, K. C. M.; BROEN, J. C. A.; VAN BON, L.; ABDOLLAHI-ROODSAZ, S.; POPA, C.; HUIJBENS, R.; REMIJN, T.; LUBBERTS, E.; VAN RIEL, P. L. C. M.; VAN DEN BERG, W. B.; RADSTAKE, T. R. D. J. TLR2 promotes Th2/Th17 responses via TLR4 and TLR7/8 by abrogating the type I IFN amplification loop. **Journal of Immunology**, Baltimore, Md., v. 183, n. 11, p. 6960–

6970, 2009.

WHITNALL, M. H. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. **Progress in Neurobiology**, v. 40, n. 5, p. 573–629, 1993.

WILLIAMS, I. R. CCR6 and CCL20: partners in intestinal immunity and lymphorganogenesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1072, p. 52–61, 2006.

WILLIAMS, R. B.; MARSHALL, R. N.; LA RAGIONE, R. M.; CATCHPOLE, J. A new method for the experimental production of necrotic enteritis and its use for studies on the relationships between necrotic enteritis, coccidiosis and anticoccidial vaccination of chickens. **Parasitology Research**, v. 90, n. 1, p. 19–26, 2003.

WILLIAMSON, E. D.; TITBALL, R. W. A genetically engineered vaccine against the alpha-toxin of *Clostridium perfringens* protects mice against experimental gas gangrene. **Vaccine**, v. 11, n. 12, p. 1253–1258, 1993.

WINGFIELD, J. C.; SILVERIN, B. Effects of corticosterone on territorial behavior of free-living male song sparrows *Melospiza melodia*. **Hormones and Behavior**, v. 20, n. 4, p. 405–417, 1986.

WIT, A.; WANG, S. C. Temperature-sensitive neurons in preoptic-anterior hypothalamic region: effects of increasing ambient temperature. **The American Journal of Physiology**, v. 215, n. 5, p. 1151–1159, 1968.

WU, Z.; HU, T.; KAISER, P. Chicken CCR6 and CCR7 are markers for immature and mature dendritic cells respectively. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 5, p. 563–567, 2011.

YANG, X. J.; LI, W. L.; FENG, Y.; YAO, J. H. Effects of immune stress on growth performance, immunity, and cecal microflora in chickens. **Poultry Science**, v. 90, n. 12, p. 2740–2746, 2011.

YOUNG, E. A.; AKANA, S.; DALLMAN, M. F. Decreased sensitivity to glucocorticoid fast feedback in chronically stressed rats. **Neuroendocrinology**, v. 51, n. 5, p. 536–542, 1990.

YUN, C. H.; LILLEHOJ, H. S.; LILLEHOJ, E. P. Intestinal immune responses to coccidiosis. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 24, n. 2-3, p. 303–324, 2000.

ZAHRAA, H.; GHAMDI, A. Effects of commutative heat stress on immunoresponses in broiler chickens reared in closed system. **International Journal of Poultry Science**, v. 7, p. 964–968, 2008.

ZALCMAN, S.; GREEN-JOHNSON, J. M.; MURRAY, L.; NANCE, D. M.; DYCK, D.; ANISMAN, H.; GREENBERG, A. H. Cytokine-specific central monoamine alterations induced by interleukin-1, -2 and -6. **Brain Research**, v. 643, n. 1-2, p. 40–49, 1994.

ZEKARIAS, B.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; POST, J.; BALK, F.; VAN REENEN, C.; GRUYS, E.; REBEL, J. M. J. The pathogenesis of and susceptibility to malabsorption syndrome in broilers is associated with heterophil influx into the intestinal mucosa and epithelial apoptosis. **Avian Pathology: journal of the W.V.P.A.**, v. 34, n. 5, p. 402–407, 2005.

ZENTEL, H. J.; NOHR, D.; ALBRECHT, R.; JEURISSEN, S. H.; VAINIO, O.; WEIHE, E. Peptidergic innervation of the Bursa Fabricii: interrelation with T-lymphocyte subsets. **International Journal of Neuroscience**, v. 59, n. 1-3, p. 177–188, 1991.

ZENTEL, H. J.; WEIHE, E. The neuro-B cell link of peptidergic innervation in the Bursa Fabricii. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 5, n. 1, p. 132–147, 1991.

ZHANG, Y.-G.; WU, S.; XIA, Y.; SUN, J. Salmonella infection upregulates the leaky protein claudin-2 in intestinal epithelial cells. **PloS One**, v. 8, n. 3, p. e58606, 2013.

ZHAO, G.-H.; CHENG, W.-Y.; WANG, W.; JIA, Y.-Q.; FANG, Y.-Q.; DU, S.-Z.; YU, S.-K. The expression dynamics of IL-17 and Th17 response relative cytokines in the trachea and spleen of chickens after infection with *Cryptosporidium baileyi*. **Parasites & Vectors**, v. 7, n.1, p. 1-7, 2014.

ZHAO, J. P.; JIAO, H. C.; JIANG, Y. B.; SONG, Z. G.; WANG, X. J.; LIN, H. Cool perches improve the growth performance and welfare status of broiler chickens reared at different stocking densities and high temperatures. **Poultry Science**, v. 92, n. 8, p. 1962–1971, 2013.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations. **Annual Review of Immunology**, v. 28, p. 445–489, 2010.

ZIEGLER, D. R.; HERMAN, J. P. Neurocircuitry of stress integration: anatomical pathways regulating the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis of the rat. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, p. 541–551, 2002.

ZULKIFLI, I.; ABDULLLAH, N.; AZRIN, N. M.; HO, Y. W.; ZORRILLA, E. P.; MAYAMEEI, A.; et al. Neuroendocrine-immune interactions. **Poultry Science**, v. 21, n. 2, p. 374–381, 1997.

ZULKIFLI, I.; ABDULLLAH, N.; AZRIN, N. M.; HO, Y. W. Growth performance and immune response of two commercial broiler strains fed diets containing *Lactobacillus* cultures and oxytetracycline under heat stress conditions. **British Poultry Science**, v. 41, n. 5, p. 593–597, 2000.

APÊNDICE A - Resultados relativos ao capítulo 8

Tabela 7 - Quantificação dos neurotransmissores no córtex pré-frontal (média±SE)

	C	C/HS34	Ei	Ei/HS34	Cp	Cp/HS34	Ei+Cp	Ei+Cp/HS34
DA	123 ^a	268 ^a	90 ^a	241 ^a	189 ^a	148 ^a	253 ^a	289 ^a
	±19	±99	±11	±94	±59	±51	±65	±89
DOPAC	38 ^a	99 ^b	29 ^a	118 ^{b,c}	37 ^a	101 ^b	47 ^{a,c}	84 ^{a,b}
	±14	±17	±3	±67	±20	±39	±21	±31
HVA	187 ^a	123 ^a	86 ^a	198 ^a	247 ^a	156 ^a	247 ^a	184 ^a
	±80	±30	±125	±45	±119	±35	±100	±52
5-HT	688 ^a	1041 ^b	757 ^a	1055 ^b	680 ^a	1064 ^b	771 ^{a,b}	932 ^{a,b}
	±69	±60	±80	±95	±34	±65	±65	±78
5-HIAA	95 ^a	142 ^{a,b}	167 ^{a,b}	158 ^{a,b}	95 ^a	191 ^b	158 ^{a,b}	144 ^{a,b}
	±14	±12	±10	±18	±15	±18	±44	±20
NOR+AD	287 ^a	72 ^b	264 ^a	55 ^b	247 ^a	90 ^{a,b}	476 ^a	47 ^b
	±28	±7	±31	±6	±22	±19	±116	±7
MHPG	NA ^a	148 ^b	NA ^a	176 ^b	NA ^a	172 ^b	NA ^a	151 ^b
		±13		±10		±15		±15
5-HIAA/5-HT	0.14 ^a	0.13 ^a	0.15 ^a	0.16 ^a	0.13 ^a	0.18 ^a	0.18 ^a	0.16 ^a
	±0.015	±0.008	±0.01	±0.03	±0.02	±0.05	±0.10	±0.02
DOPAC/DA	0.21 ^a	0.6 ^{a,b}	0.36 ^{a,b}	0.71 ^{a,b}	0.27 ^{a,b}	1.31 ^b	0.38 ^{a,b}	0.70 ^{a,b}
	±0.03	2±0.18	±0.04	±0.51	±0.23	±0.23	±0.15	±0.21
HVA/DA	2.28 ^a	0.48 ^a	1.19 ^a	0.81 ^a	2.36 ^a	1.36 ^a	2.22 ^a	1.19 ^a
	±1.23	±0.09	±0.65	±0.20	±1.21	±0.58	±1.23	±0.33

Fonte: (CALEFI, 2016)

Nota: Valores de DA, DOPAC, HVA, 5-HT, 5-HIAA, NOR+AD e MHPG estão expressos em ng/g de tecido. As diferentes letras sobre as médias indicam diferenças significantes com $P < 0.05$ (teste de Tukey HSD). Grupo controle (C); grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp. (Ei+Cp). /HS34 indica o grupo estressado por calor. NA – não detectado.

Tabela 8 - Quantificação dos neurotransmissores no hipotálamo (média±SE)

	C	C/HS34	Ei	Ei/HS34	Cp	Cp/HS34	Ei+Cp	Ei+Cp/HS34
DA	554 ^{a,b}	406 ^{a,b}	441 ^{a,b}	309 ^{a,b}	580 ^b	320 ^a	610 ^b	252 ^a
	±112	±60	±93	±26	±88	±45	±44	±36
DOPAC	104 ^a	159 ^a	96 ^a	123 ^a	111 ^a	140 ^a	114 ^a	98 ^a
	±12	±20	±19	±8	±12	±13	±11	±18
HVA	144 ^a	1368 ^b	116 ^a	1522 ^b	159 ^a	1205 ^b	217 ^a	997 ^b
	±27	±101	±29	±239	±80	±128	±38	±163
5-HT	1845 ^a	864 ^b	1580 ^a	849 ^b	1596 ^a	825 ^b	2091 ^a	754 ^b
	±203	±95	±262	±120	±213	±126	±121	±156
5-HIAA	447 ^a	627 ^a	445 ^a	544 ^a	467 ^a	587 ^a	609 ^a	402 ^a
	±41	±68	±78	±35	±53	±39	±60	±80
NOR+AD	1478 ^a	110 ^b	1467 ^a	105 ^b	1664 ^a	142 ^b	2289 ^a	114 ^b
	±212	±12	±219	±21	±259	±35	±108	±24
MHPG	NA ^a	1443 ^b	NA	1330 ^b	NA ^a	1338 ^b	NA ^a	1171 ^b
		±95		±127		±118		±174
5-HIAA/5-HT	0.20 ^a	0.72 ^{a,b}	0.28 ^a	0.55 ^{a,b}	0.26 ^a	0.87 ^{a,b}	0.28 ^a	1.45 ^b
	±0.01	±0.09	±0.03	±0.09	±0.02	±0.13	±0.01	±0.62
DOPAC/DA	0.17 ^{a,b}	0.51 ^{a,b}	0.19 ^{a,b}	0.40 ^{a,b}	0.30 ^{a,b}	0.45 ^{a,b}	0.17 ^a	0.72 ^b
	±0.03	±0.18	±0.05	±0.08	±0.12	±0.06	±0.01	±0.18

HVA/DA	0.12 ^a ±0.03	4.40 ^b ±1.09	0.36 ^a ±0.11	5.50 ^b ±1.05	0.39 ^a ±0.13	4.47 ^b ±0.84	0.32 ^a ±0.05	4.04 ^b ±0.43
--------	----------------------------	----------------------------	----------------------------	----------------------------	----------------------------	----------------------------	----------------------------	----------------------------

Fonte: (CALEFI, 2016)

Nota: Valores de DA, DOPAC, HVA, 5-HT, 5-HIAA, NOR+AD e MHPG estão expressos em ng/g de tecido. As diferentes letras sobre as médias indicam diferenças significantes com $P < 0.05$ (teste de Tukey HSD). Grupo controle (C); grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp. (Ei+Cp). /HS34 indica o grupo estressado por calor. NA – não detectado.

Tabela 9 - Quantificação dos neurotransmissores no mesencéfalo (média±SE)

	C	C/HS34	Ei	Ei/HS34	Cp	Cp/HS34	Ei+Cp	Ei+Cp/HS34
DA	406 ^a ±43	191 ^b ±68	401 ^a ±55	105 ^b ±19	480 ^a ±52	115 ^b ±20	338 ^a ±71	113 ^b ±27
DOPAC	78 ^a ±12	94 ^a ±11	96 ^a ±18	73 ^a ±21	128 ^a ±25	63 ^a ±9	67 ^a ±13	78 ^a ±19
HVA	229 ^a ±68	144 ^a ±35	214 ^a ±75	187 ^a ±69	342 ^a ±128	152 ^a ±39	132 ^a ±19	235 ^a ±61
5-HT	1212 ^a ±113	772 ^{a,b} ±99	1398 ^a ±103	627 ^b ±93	1420 ^a ±150	795 ^b ±95	1329 ^a ±154	712 ^b ±111
5-HIAA	346 ^{a,b} ±34	363 ^{a,b} ±41	512 ^a ±76	271 ^b ±38	396 ^{a,b} ±47	375 ^{a,b} ±61	402 ^{a,b} ±35	251 ^{a,b} ±39
NOR+AD	1168 ^a ±119	126 ^b ±24	1170 ^a ±110	112 ^b ±26	1276 ^a ±201	97 ^b ±29	1070 ^a ±173	65 ^a ±15
MHPG	NA ^a ±66	605 ^b ±66	NA ^a ±65	593 ^b ±65	NA ^a ±115	466 ^b ±115	NA ^a ±115	641 ^a ±101
5-HIAA/5-HT	0.29 ^a ±0.02	0.51 ^b ±0.07	0.33 ^{a,b} ±0.04	0.45 ^{a,b} ±0.03	0.28 ^a ±0.01	0.46 ^{a,b} ±0.03	0.32 ^{a,b} ±0.03	0.35 ^{a,b} ±0.03
DOPAC/DA	0.19 ^a ±0.02	0.78 ^{a,b} ±0.15	0.21 ^b ±0.10	0.86 ^a ±0.08	0.32 ^{a,b} ±0.02	0.59 ^{a,b} ±0.26	0.23 ^{s,b} ±0.02	0.87 ^a ±0.25
HVA/DA	0.76 ^a ±68	1.23 ^a ±35	0.60 ^a ±75	1.65 ^a ±69	0.94 ^a ±128	1.03 ^a ±39	0.69 ^a ±19	1.52 ^a ±61

Fonte: (CALEFI, 2016)

Nota: Valores de DA, DOPAC, HVA, 5-HT, 5-HIAA, NOR+AD e MHPG estão expressos em ng/g de tecido. As diferentes letras sobre as médias indicam diferenças significantes com $P < 0.05$ (teste de Tukey HSD). Grupo controle (C); grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp. (Ei+Cp). /HS34 indica o grupo estressado por calor. NA – não detectado.

Tabela 10 - Quantificação dos neurotransmissores no tronco encefálico (média±SE)

	C	C/HS34	Ei	Ei/HS34	Cp	Cp/HS34	Ei+Cp	Ei+Cp/HS34
DA	232 ^a ±18	199 ^a ±27	185 ^a ±14	168 ^a ±13	178 ^a ±6	183 ^a ±28	178 ^a ±18	180 ^a ±18
DOPAC	44 ^a ±13	207 ^b ±22	23 ^a ±3	188 ^b ±23	35 ^a ±6	215 ^a ±20	51 ^b ±10	222 ^a ±17
HVA	52 ^a ±4	247 ^a ±93	63 ^a ±11	128 ^a ±42	110 ^a ±62	201 ^a ±69	65 ^a ±13	235 ^a ±64
5-HT	1298 ^a ±136	1073 ^a ±170	1370 ^a ±148	1117 ^a ±62	1353 ^a ±46	1081 ^a ±95	1358 ^a ±115	908 ^a ±98
5-HIAA	338 ^a ±32	467 ^a ±36	432 ^a ±25	402 ^a ±30	353 ^a ±30	442 ^a ±47	355 ^a ±32	329 ^a ±49
NOR+AD	1111 ^a ±64	201 ^b ±40	1057 ^a ±98	183 ^b ±37	1070 ^a ±70	222 ^b ±19	1020 ^a ±107	174 ^a ±18

MHPG	NA ^a	1055 ^b ±69	NA ^a	907 ^b ±62	NA ^a	871 ^b ±100	NA ^a	915 ^a ±87
5-HIAA/5-HT	0.28 ^a ±0.02	0.71 ^b ±0.21	0.31 ^{a,b} ±0.03	0.36 ^{a,b} ±0.01	0.27 ^a ±0.03	0.40 ^{a,b} ±0.03	0.30 ^a ±0.03	0.42 ^{a,b} ±0.11
DOPAC/DA	0.17 ^a ±0.03	1.21 ^b ±0.17	0.11 ^a ±0.00	1.21 ^b ±0.12	0.19 ^a ±0.02	1.27 ^b ±0.19	0.28 ^a ±0.05	1.29 ^b ±0.10
HVA/DA	0.24 ^a ±0.02	1.69 ^a ±0.88	0.29 ^a ±0.02	0.85 ^a ±0.30	0.58 ^a ±0.29	1.45 ^a ±0.62	0.36 ^a ±0.07	1.34 ^a ±0.38

Fonte: (CALEFI, 2016)

Nota: Valores de DA, DOPAC, HVA, 5-HT, 5-HIAA, NOR+AD e MHPG estão expressos em ng/g de tecido. As diferentes letras sobre as médias indicam diferenças significantes com $P < 0.05$ (teste de Tukey HSD). Grupo controle (C); grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp. (Ei+Cp). /HS34 indica o grupo estressado por calor. NA – não detectado.

APÊNDICE B - Resultados relativos ao capítulo 9

Tabela 11- Escores de lesão histopatológicos do duodeno, jejuno e íleo (mediana [max/min])

	C	C/HS34	Ei	Ei/HS34	Cp	Cp/HS34	Ei+Cp	Ei+Cp/HS34
Duodeno								
Necrose	0 ^a (0/0)	0 ^a (0/0)	1 ^{a,b} (2/1)	1 ^{a,b} (1/0)	1 ^{a,b} (3/0)	1 ^{a,b} (3/0)	2 ^b (3/1)	1 ^b (3/1)
Fusão de Vilos	0 ^a (0/0)	0 ^a (0/0)	1 ^{a,b} (3/0)	0 ^{a,b} (3/0)	0 ^{a,b} (3/0)	1 ^{a,b} (3/0)	2 ^b (3/1)	0 ^{a,b} (3/0)
Infiltrado de Heterófilos nos vilos	0 ^a (2/0)	0 ^a (0/0)	0 ^a (1/0)	0 ^a (1/0)	0 ^a (3/0)	0 ^a (2/0)	1 ^b (3/0)	0 ^a (3/0)
Infiltrado de Heterófilos na cripta	0 ^a (1/0)	0 ^a (0/0)	0 ^a (1/0)	0 ^a (1/0)	0 ^a (2/0)	0 ^a (2/0)	0 ^a (3/0)	0 ^a (3/0)
Infiltrado Mononuclear	0 ^a (2/0)	0 ^a (1/0)	2 ^b (3/2)	2 ^{a,b} (3/1)	1 ^{a,b} (3/0)	1 ^{a,b} (3/0)	3 ^b (3/2)	2 ^b (3/1)
Jejuno								
Necrose	0 ^a (1/0)	0 ^a (0/0)	1 ^{a,b} (1/0)	0 ^{a,b} (1/0)	0 ^{a,b} (2/0)	1 ^{a,b} (2/0)	2 ^b (3/1)	1 ^{a,b} (1/1)
Fusão de Vilos	0 ^a (0/0)	0 ^a (1/0)	1 ^a (3/0)	0 ^a (1/0)	0 ^a (2/0)	0 ^a (2/0)	1 ^a (3/0)	0 ^a (3/0)
Infiltrado de Heterófilos nos vilos	0 ^a (1/0)	0 ^a (0/0)	1 ^a (3/0)	0 ^a (0/0)	0 ^a (1/0)	1 ^a (2/0)	2 ^a (3/0)	0 ^a (1/0)
Infiltrado de Heterófilos na cripta	0 ^a (1/0)	0 ^a (0/0)	0 ^a (2/0)	0 ^a (1/0)	0 ^a (1/0)	0 ^a (2/0)	1 ^a (3/0)	0 ^a (2/0)
Infiltrado Mononuclear	0 ^a (0/0)	0 ^{a,b} (1/0)	2 ^b (3/1)	1 ^{a,b} (2/1)	2 ^a (3/0)	1 ^{a,b} (2/0)	3 ^b (3/1)	1 ^{a,b} (3/1)
Íleo								
Necrose	0 ^a (0/0)	0 ^a (0/0)	0 ^a (1/0)	0 ^a (1/0)	0 ^a (1/0)	0 ^a (3/0)	1 ^a (3/0)	1 ^a (2/0)
Fusão de Vilos	0 ^a (0/0)	0 ^a (0/0)	0 ^a (3/0)	0 ^a (0/0)	0 ^a (2/0)	0 ^a (3/0)	1 ^a (3/0)	0 ^a (3/0)
Infiltrado de Heterófilos nos vilos	0 ^a (0/0)	0 ^a (0/0)	0 ^a (3/0)	0 ^a (0/0)	0 ^a (0/0)	0 ^a (3/0)	1 ^a (3/0)	0 ^a (1/0)
Infiltrado de Heterófilos na cripta	0 ^a (0/0)	0 ^a (0/0)	0 ^a (1/0)	0 ^a (1/0)	0 ^a (2/0)	0 ^a (3/0)	1 ^a (3/0)	0 ^a (0/0)
Infiltrado	0 ^a (0/0)	0 ^a (1/0)	2 ^a (2/1)	1 ^a (1/1)	1 ^a (2/0)	0 ^a (3/0)	2 ^a (3/1)	1 ^a (3/1)

Mononuclear

Fonte: (CALEFI, 2016)

Nota: As diferentes letras sobre as medianas indicam diferenças significantes com $P < 0.05$ (Kruskal-Wallis de uma via seguido pelo teste de comparações múltiplas [kruskalmc]). Grupo controle (C); grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

Tabela 12 - Frequência de ocorrência de abscesso e lesão transmural no duodeno, jejuno e íleo

	C	C/HS34	Ei	Ei/HS34	Cp	Cp/HS34	Ei+Cp	Ei+Cp/HS34
Duodeno								
Abscesso	0	0	0	0	1	3	3	1
Lesão transmural	0	0	0	0	1	0	0	0
Jejuno								
Abscesso	0	0	0	0	1	3	2	0
Lesão transmural	0	0	0	0	0	0	0	0
Íleo								
Abscesso	0	0	0	0	0	1	0	0
Lesão transmural	0	0	0	0	0	1	0	0

Fonte: (CALEFI, 2016)

Nota: Grupo controle (C); grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

Tabela 13 - Expressão relativa das citocinas no duodeno dos frangos de corte

	C	C/HS35	Ei	Ei/HS35	Cp	Cp/HS35	Ei+Cp	Ei+Cp/HS35
IFN-α	0	1,64* [#]	0,25	1,65	-0,01	-0,15*	0,5	0,56
	$\pm 0,19$	$\pm 0,17$	$\pm 0,29$	$\pm 0,15$	$\pm 0,29$	$\pm 0,08$	$\pm 0,36$	$\pm 0,28$
IFN-γ	0	1,77	1,24	2,08	1,27	1,31*	1,74	1,45
	$\pm 0,22$	$\pm 0,57$	$\pm 0,65$	$\pm 0,5$	$\pm 0,42$	$\pm 0,17$	$\pm 0,32$	$\pm 0,4$
IL-1	0	1,7*	0,07*	1,63*	1,46	1,76* [#]	1,86*	1,6
	$\pm 0,19$	$\pm 0,3$	$\pm 0,17$	$\pm 0,21$	$\pm 0,23$	$\pm 0,07$	$\pm 0,33$	$\pm 0,51$
IL-2	0	0,73	-0,34	1,14	-0,93	-0,64 [#]	-0,1	-0,19
	$\pm 0,11$	$\pm 0,22$	$\pm 0,42$	$\pm 0,16$	$\pm 0,17$	$\pm 0,27$	$\pm 0,51$	$\pm 0,41$
IL-4	0	0,45	1,28	1,59	1,87	1,59	2,44	2,39
	$\pm 1,05$	$\pm 0,2$	$\pm 1,05$	$\pm 0,99$	$\pm 0,26$	$\pm 0,18$	$\pm 0,55$	$\pm 0,51$
IL-6	0	-14,64	-5,56	-6,59	-7,87	-8,09	-3,79	-7,65

	±0	±10,3	±5,56	±6,59	±4,03	±3,68	±1,61	±3,39
	0	1,33*	0,09	1,43*	0,52	0,56*#	1,07	1,22*
IL-10	±0,13	±0,15	±0,33	±0,18	±0,19	±0,05	±0,32	±0,22
	0	0,2	0,08	1,55	0,58	0,66*#	0,8	0,76
IL-12	±0,16	±0,16	±0,36	±0,19	±0,15	±0,17	±0,5	±0,27
	0	1,71	-2,43	2,11	-0,1	-0,17#	0,39	0,8
IL-13	±0,2	±0,21	±2,5	±0,29	±0,32	±0,12	±0,37	±0,27
	0	0,95	-0,26	1,08	0,39	0,34#	0,46	0,45
IL-16	±0,26	±0,19	±0,42	±0,15	±0,29	±0,11	±0,28	±0,2
	0	-3,5	6,21	-2,35	2,37	8,24	2,28	6,5
IL-17	±1,46	±4,72	±3,02	±3,06	±5,49	±1,64	±1,45	±2,78
	0	1,24	-0,19	0,73	0,25	0,01	0,49	0,5
LITAF	±0,16	±0,11	±0,09	±0,91	±0,28	±0,15	±0,31	±0,28
	0	8,6	2,78	4,51	2,34	7,26	14,56	11,87
MIP1α	±0,17	±4,28	±2,7	±2,94	±1,56	±4,57	±4,09	±4,65
	0	1,8	1,58	3,67	0,59	5,95	2,74	3,74
MIP3α	±1,63	±1,17	±1,97	±1,5	±2,85	±3,32	±2,12	±2,12
	0	2,58*	0,78	2,59	1,25	1,11*	1,23	1,31
TGF-β	±1,02	±0,08	±0,2	±0,21	±0,25	±0,12	±0,29	±0,4
	0	1,64*	0,05	2,04*	0,37	0,78*#	1,56	1,38*
TNFSF15	±0,11	±0,07	±0,2	±0,17	±0,46	±0,12	±0,28	±0,32

Fonte: (CALEFI, 2016)

Nota: as diferentes letras sobre as medianas indicam diferenças significantes com $p < 0.05$ (ANOVA com permutação seguido do teste TukeyHSD). * Representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C. # Representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo não estressado de mesmo tratamento. Grupo controle (C); grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

Tabela 14 - Expressão relativa das citocinas no jejuno dos frangos de corte

	C	C/HS35	Ei	Ei/HS35	Cp	Cp/HS35	Ei+Cp	Ei+Cp/HS35
				5		5		5
	0	1,09	0,06	0,52	0,2	-0,36	0,79	1,55
IFN-α	±0,23	±0,23	±0,18	±0,24	±0,21	±0,21	±0,35	±0,34
	0	0,54	-0,45*	0,23	1,59	1,24	2,21*	2,6*
IFN-γ	±0,27	±0,51	±0,17	±0,56	±0,34	±0,28	±0,29	±0,42
	0	0,72	0,04*	0,77	1,19	0,57	1,42*	2,1
IL-1	±0,29	±0,54	±0,11	±0,3	±0,13	±0,18	±0,41	±0,57
	0	0,86	-0,67	0,68	-0,14	-0,12	0,25	3,97
IL-2	±0,24	±0,25	±0,37	±0,24	±0,22	±0,11	±0,5	±2,52
	0	1,25	-0,16	0,91	-0,38	-0,97	0,58	1,96
IL-4	±0,29	±0,48	±0,46	±0,77	±0,58	±1,08	±0,57	±0,19
	0	1,86	0	0	3,09	10,47	0	7,75
IL-6	±0	±2,4	±0	±0	±3,76	±5,96	±0	±5,01
	0	1,25	-0,01*	1,04#	0,47	0,18#	1,32	2,01
IL-10	±0,28	±0,35	±0,22	±0,25	±0,19	±0,08	±0,37	±0,31
	0	0,94	-0,74*	1,47	0,47	0,26	0,91	1,59
IL-12	±0,42	±0,59	±0,28	±0,39	±0,25	±0,24	±0,41	±0,29
	0	-0,05	0,45	0,82	0,79	-1,18	1,33	1,86
IL-13	±0,42	±1,24	±0,31	±0,22	±0,13	±1,29	±0,45	±0,63
	0	0,66	0,47	0,83	0,34	0,62	1,88	2,31
IL-16	±0,42	±0,39	±0,21	±0,24	±0,43	±0,13	±0,4	±0,43
	0	-1,59	-4,71	-1,68	-8,08	1,68	3,35	4,47
IL-17	±2,52	±5,02	±6,41	±4,52	±7,17	±1	±1,38	±1,41
	0	0,25	-0,05	0,63	-0,47	0,25	1,11	1,78
LITAF	±0,28	±0,42	±0,06	±0,15	±1,17	±0,27	±0,42	±0,33
	0	-0,22	6,39	-0,75	4,46	9,73	7,8	-3,73
MIP1α	±3,47	±3,54	±3,07	±2,66	±3,8	±2,31	±4,8	±4,76

	0	0,99	-1,07	2,69*	0,77	3,32	-0,33	3
MIP3α	$\pm 0,61$	$\pm 0,99$	$\pm 1,46$	$\pm 2,98$	$\pm 1,17$	$\pm 2,73$	$\pm 0,35$	$\pm 1,26$
	0	0,23	0,03	0,77	0,48	0,39	1,22	1,61
TGF-β	$\pm 0,23$	$\pm 0,15$	$\pm 0,17$	$\pm 0,12$	$\pm 0,26$	$\pm 0,13$	$\pm 0,37$	$\pm 0,53$
	0	-0,1	-0,04	0,54	0,39	-0,39	0,87*	1,33*
TNFSF15	$\pm 0,07$	$\pm 0,3$	$\pm 0,21$	$\pm 0,2$	$\pm 0,21$	$\pm 0,21$	$\pm 0,44$	$\pm 0,49$

Fonte: (CALEFI, 2016)

Nota: as diferentes letras sobre as medianas indicam diferenças significantes com $p < 0.05$ (ANOVA com permutação seguido do teste TukeyHSD). * Representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C. # Representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo não estressado de mesmo tratamento. Grupo controle (C); grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

Tabela 15 - Expressão relativa das citocinas no íleo dos frangos de corte

	C	C/HS35	Ei	Ei/HS35	Cp	Cp/HS35	Ei+Cp	Ei+Cp/HS35
	0	0,47	0,19	0,41	0,45	0,29	0,03	0,35
IFN-α	$\pm 0,13$	$\pm 0,2$	$\pm 0,08$	$\pm 0,15$	$\pm 0,21$	$\pm 0,33$	$\pm 0,18$	$\pm 0,21$
	0	0,39	-0,48*	0,59	1,93	1,46	1,17*	1,93*
IFN-γ	$\pm 0,38$	$\pm 0,27$	$\pm 0,29$	$\pm 0,25$	$\pm 0,45$	$\pm 0,23$	$\pm 0,26$	$\pm 0,25$
	0	-0,21	-0,23*	0,7	2,39	1,67	0,24*	0,61 [#]
IL-1	$\pm 0,16$	$\pm 0,1$	$\pm 0,25$	$\pm 0,46$	$\pm 0,49$	$\pm 0,4$	$\pm 0,27$	$\pm 0,23$
	0	0,24	0,06	0,68	0,09	0,7	2,57	0,48
IL-2	$\pm 0,23$	$\pm 0,3$	$\pm 0,35$	$\pm 0,43$	$\pm 0,32$	$\pm 0,56$	$\pm 2,12$	$\pm 0,26$
	0	2,16	0,92	2,21	2,36	2,14	2,08	2,66
IL-4	$\pm 1,44$	$\pm 0,79$	$\pm 0,78$	$\pm 0,54$	$\pm 0,72$	$\pm 0,55$	$\pm 0,35$	$\pm 0,12$
	0	0	0	0	0	0	0	0
IL-6	± 0	± 0	± 0	± 0	± 0	± 0	± 0	± 0
	0	-0,04	0,98*	-0,11 [#]	1	1,35 [#]	0,02	0,49
IL-10	$\pm 0,08$	$\pm 0,16$	$\pm 0,35$	$\pm 0,11$	$\pm 0,24$	$\pm 0,37$	$\pm 0,19$	$\pm 0,16$
	0	0,29	1,32	0,61	1,06	1,61	0,58	1,32
IL-12	$\pm 0,43$	$\pm 0,31$	$\pm 0,16$	$\pm 0,25$	$\pm 0,14$	$\pm 0,48$	$\pm 0,22$	$\pm 0,28$
	0	1,32	-0,44*	1,6	1,74	1,03	-0,11	1,86
IL-13	$\pm 0,82$	$\pm 0,33$	$\pm 1,45$	$\pm 0,3$	$\pm 0,23$	$\pm 0,68$	$\pm 1,46$	$\pm 0,31$
	0	0,38	-0,11	0,42	0,47	0	0,09	0,38
IL-16	$\pm 0,2$	$\pm 0,19$	$\pm 0,16$	$\pm 0,14$	$\pm 0,52$	$\pm 0,28$	$\pm 0,19$	$\pm 0,19$
	0	-7,72	-0,21	-4,94	-4,21	-4,99	-0,53	-7,83
IL-17	$\pm 1,24$	$\pm 4,29$	$\pm 0,83$	$\pm 5,66$	$\pm 6,06$	$\pm 6,07$	$\pm 1,43$	$\pm 6,11$
	0	0	-1,23	0,05	0,31	0,24	-0,26	0,36
LITAF	$\pm 0,07$	$\pm 0,15$	$\pm 0,92$	$\pm 0,09$	$\pm 0,21$	$\pm 0,16$	$\pm 0,23$	$\pm 0,17$
	0	2,57	0,85	8,75	-0,9	2,85	6,6	-2,17
MIP1α	$\pm 3,65$	$\pm 5,09$	$\pm 3,66$	$\pm 4,03$	$\pm 2,39$	$\pm 3,33$	$\pm 5,6$	$\pm 2,2$
	0	-4,8	-8,11	-8,71*	-8,93	-6,42	-13,75	-6,13
MIP3α	$\pm 2,45$	$\pm 4,59$	$\pm 2,41$	$\pm 2,86$	$\pm 3,18$	$\pm 1,03$	$\pm 0,96$	$\pm 2,47$
	0	0,51	0,06	0,42	0,6	0,83	0,72	1,07
TGF-β	$\pm 0,19$	$\pm 0,06$	$\pm 0,23$	$\pm 0,17$	$\pm 0,32$	$\pm 0,44$	$\pm 0,26$	$\pm 0,19$
	0	0,31	0,16	0,09	0,6	0,21	-0,02*	0,8*
TNFSF15	$\pm 0,15$	$\pm 0,16$	$\pm 0,11$	$\pm 0,1$	$\pm 0,12$	$\pm 0,09$	$\pm 0,1$	$\pm 0,13$

Fonte: (CALEFI, 2016)

Nota: as diferentes letras sobre as medianas indicam diferenças significantes com $p < 0.05$ (ANOVA com permutação seguido do teste TukeyHSD). * Representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C. # Representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo não estressado de mesmo tratamento. Grupo controle (C); grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

Tabela 16 - Expressão relativa das citocinas na tonsila cecal dos frangos de corte

	C/HS3		Ei/HS3		Cp/HS3		Ei+Cp/HS3	
	C	5	Ei	5	Cp	5	Ei+Cp	5
IFN-α	0	1,78*	1,13	0,96	-0,19	1,03	1,34	0,91
	$\pm 0,8$	$\pm 0,25$	$\pm 0,34$	$\pm 0,17$	$\pm 0,4$	$\pm 0,14$	$\pm 0,12$	$\pm 0,11$
IFN-γ	0	0,8	0,7	0,77	0,77	0,47	0,29	0,2
	$\pm 0,43$	$\pm 0,49$	$\pm 0,33$	$\pm 0,17$	$\pm 0,42$	$\pm 0,34$	$\pm 0,54$	$\pm 0,42$
IL-1	0	0,87	-0,88	2,09 [#]	-0,16	-1,25 [#]	1,02	1,57
	$\pm 0,51$	$\pm 0,64$	$\pm 0,69$	$\pm 0,2$	$\pm 0,16$	$\pm 0,4$	$\pm 0,55$	$\pm 0,26$
IL-2	0	0,5	-0,13	-0,16	-0,62	-0,14	0,19	-0,17
	$\pm 0,21$	$\pm 0,4$	$\pm 0,23$	$\pm 0,15$	$\pm 0,27$	$\pm 0,16$	$\pm 0,24$	$\pm 0,12$
IL-4	0	-0,14	-1,11	-0,5	-1,01	-0,45	-0,68	-0,71
	$\pm 0,21$	$\pm 0,67$	$\pm 0,45$	$\pm 0,21$	$\pm 0,44$	$\pm 0,17$	$\pm 0,39$	$\pm 0,45$
IL-6	0	0	0	0	0	0	0	0
	± 0	± 0	± 0	± 0	± 0	± 0	± 0	± 0
IL-10	0	0,68	-0,04	-0,14	-0,66	-0,28	-0,14	-0,24
	$\pm 0,12$	$\pm 0,38$	$\pm 0,25$	$\pm 0,09$	$\pm 0,11$	$\pm 0,14$	$\pm 0,14$	$\pm 0,08$
IL-12	0	0,58	0	0,47	0,02	0,39	0,53	0,32
	$\pm 0,35$	$\pm 0,27$	$\pm 0,25$	$\pm 0,18$	$\pm 0,34$	$\pm 0,57$	$\pm 0,15$	$\pm 0,33$
IL-13	0	-0,14	-0,21	0,3	-0,24	-0,21	0,19	-0,17
	$\pm 0,25$	$\pm 0,16$	$\pm 0,29$	$\pm 0,19$	$\pm 0,26$	$\pm 0,21$	$\pm 0,14$	$\pm 0,1$
IL-16	0	0,55	-0,09	-0,1	0,3	0,82	0,71	-0,46
	$\pm 0,35$	$\pm 0,42$	$\pm 0,98$	$\pm 0,53$	$\pm 0,45$	$\pm 0,23$	$\pm 0,15$	$\pm 1,31$
IL-17	0	-2,31	5,55	5,41	-3,43	3,39	-8,39	-0,35
	$\pm 5,02$	$\pm 5,59$	$\pm 1,46$	$\pm 1,37$	$\pm 3,43$	$\pm 3,43$	$\pm 7,04$	$\pm 2,61$
LITAF	0	-0,43	0,13	0,05	-0,94	0,01	-0,11	-0,9
	$\pm 0,18$	$\pm 0,1$	$\pm 0,18$	$\pm 0,09$	$\pm 1,2$	$\pm 0,08$	$\pm 0,19$	$\pm 0,7$
MIP1α	0	1,3	-0,56	8,54	-0,67	-1,28	1,79	3,61
	$\pm 4,44$	$\pm 5,55$	$\pm 6,56$	$\pm 3,88$	$\pm 2,39$	$\pm 4,08$	$\pm 7,88$	$\pm 1,75$
MIP3α	0	0,04	-3,56	1,84	5,73	2,88	-5,31	0,18
	$\pm 1,85$	$\pm 0,04$	$\pm 3,35$	$\pm 3,1$	$\pm 3,21$	$\pm 2,01$	$\pm 1,74$	$\pm 0,28$
TGF-β	0	0,6	-0,5	0,68	0,35	-0,16	0,53	0,45
	$\pm 0,2$	$\pm 0,14$	$\pm 1,16$	$\pm 0,05$	$\pm 0,21$	$\pm 0,47$	$\pm 0,04$	$\pm 0,06$
TNFSF15	0	-0,6	0,49	0,19	0,28	0,29	0,33	0,49
	$\pm 0,12$	$\pm 0,83$	$\pm 0,25$	$\pm 0,07$	$\pm 0,12$	$\pm 0,07$	$\pm 0,1$	$\pm 0,14$

Fonte: (CALEFI, 2016)

Nota: as diferentes letras sobre as medianas indicam diferenças significantes com $p < 0.05$ (ANOVA com permutação seguido do teste TukeyHSD). * Representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C. # Representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo não estressado de mesmo tratamento. Grupo controle (C); grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

APÊNDICE C - Resultados relativos ao capítulo 10

Tabela 17- Expressão relativa das citocinas no baço dos frangos de corte

	C	C/HS35	Ei	Ei/HS35	Cp	Cp/HS35	Ei+Cp	Ei+Cp/HS35
IFN-α	0 $\pm 1,16$	1,27 $\pm 0,15$	1,33 $\pm 0,18$	1,51 $\pm 0,35$	1,04 $\pm 0,13$	1,29 $\pm 0,24$	0,63 $\pm 1,02$	1,58 $\pm 0,26$
IFN-γ	0 $\pm 1,18$	0,91 $\pm 0,37$	0,75 $\pm 0,31$	1,9 $\pm 0,5$	0,92 $\pm 0,21$	2,04 $\pm 0,36$	1,09 $\pm 0,36$	1,25 $\pm 0,11$
IL-1	0 $\pm 1,09$	0,62 $\pm 0,62$	1,35 $\pm 0,19$	1,27 $\pm 0,3$	0,64 $\pm 0,14$	1,11 $\pm 0,31$	1,21 $\pm 0,34$	1,02 $\pm 0,16$
IL-2	0 $\pm 1,16$	1 $\pm 0,17$	0,96 $\pm 0,2$	1,57 $\pm 0,32$	0,81 $\pm 0,17$	1,16 $\pm 0,28$	0,77 $\pm 0,3$	1,22 $\pm 0,16$
IL-4	0,41 $\pm 0,91$	0,06 $\pm 0,55$	0,32 $\pm 0,52$	0,56 $\pm 0,64$	-0,84 $\pm 0,83$	-0,06 $\pm 0,71$	-0,1 $\pm 0,49$	0,61 $\pm 0,35$
IL-6	0 $\pm 1,38$	2,13 $\pm 0,34$	1,69 $\pm 0,5$	1,46 $\pm 0,85$	0,61 $\pm 0,9$	2,56 $\pm 0,82$	2,33 $\pm 0,8$	0,42 $\pm 0,56$
IL-10	0 $\pm 1,28$	0,92 $\pm 0,33$	0,73 $\pm 0,33$	1,43 $\pm 0,35$	0,32 $\pm 0,21$	1,27 $\pm 0,32$	0,91 $\pm 0,29$	1,16 $\pm 0,18$
IL-12	0 $\pm 1,11$	0,96 $\pm 0,38$	1,01 $\pm 0,11$	1,44 $\pm 0,2$	1,06 $\pm 0,11$	1,09 $\pm 0,27$	1,03 $\pm 0,38$	0,65 $\pm 0,57$
IL-13	0 $\pm 1,42$	1 $\pm 0,83$	1,29 $\pm 0,53$	3,21 $\pm 0,48$	1,11 $\pm 0,34$	2,68 $\pm 0,19$	1,02 $\pm 0,67$	1,59 $\pm 0,33$
IL-17	0 $\pm 1,4$	3,07 $\pm 1,95$	1,61 $\pm 1,4$	6,19 $\pm 1,06$	-0,63 $\pm 1,25$	0,31 $\pm 1,65$	3,03 $\pm 1,23$	3,53 $\pm 2,31$
LITAF	0 $\pm 1,13$	0,98 $\pm 0,23$	0,85 $\pm 0,11$	1 $\pm 0,25$	0,84 $\pm 0,03$	1,07 $\pm 0,33$	1,23 $\pm 0,32$	1,26 $\pm 0,18$
MIP3α	0 $\pm 1,27$	0,8 $\pm 0,71$	0,93 $\pm 0,67$	1,43 $\pm 0,76$	-0,47 ± 1	0,87 $\pm 0,47$	1,49 $\pm 0,69$	0,93 $\pm 0,31$
TGF-β	0 $\pm 1,09$	1,13 $\pm 0,13$	1,28 $\pm 0,17$	1,34 $\pm 0,17$	0,99 $\pm 0,06$	1,05 $\pm 0,23$	1,37 $\pm 0,31$	1,18 $\pm 0,14$
TNFSF15	0 $\pm 0,07$	0,1 $\pm 0,4$	0,25 $\pm 0,14$	-3,52 $\pm 3,72$	-2,45 $\pm 2,08$	-4,19 $\pm 2,77$	-0,02 $\pm 0,37$	0,05 $\pm 0,28$

Fonte: (CALEFI, 2016)

Nota: as diferentes letras sobre as medianas indicam diferenças significantes com $p < 0.05$ (ANOVA com permutação seguido do teste TukeyHSD). Grupo controle (C); grupo infectado com *Eimeria* spp. (Ei); grupo infectado com *Clostridium perfringens* (Cp); grupo co-infectado com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp (Ei+Cp). /HS35 indica o grupo estressado por calor.

Tabela 18 - Média $\pm$ erro padrão dos diferentes fenótipos celulares esplênicos

	C	C/HS35	Ei	Ei/HS35	Cp	Cp/HS35	Ei+Cp	Ei+Cp/HS35
Bu1 ⁺	0 $\pm 0,96$	-13,77 $\pm 1,18$	0,47 $\pm 1,94$	-4,45 $\pm 1,55$	-6,53 $\pm 1,14$	-11,1 $\pm 1,2$	-1,44 $\pm 1,8$	-5,59 $\pm 1,17$
Bu1 ⁺ CD44 ⁺	0 $\pm 0,89$	3,94 $\pm 1,88$	0,26 $\pm 0,83$	1,54 $\pm 1,92$	-0,2 $\pm 1,69$	7,09 $\pm 3,66$	0,79 $\pm 0,86$	3,97 $\pm 2,04$
CD4 ⁺	0 $\pm 0,5$	17,99 $\pm 2,96$	-1,03 $\pm 1,32$	13,49 $\pm 1,61$	2,89 $\pm 1,91$	18,01 $\pm 3,83$	1,23 $\pm 0,43$	13,31 $\pm 1,16$
CD8 ⁺	0 $\pm 1,81$	20,86 $\pm 2,81$	-0,63 $\pm 2,46$	17,55 $\pm 2,02$	1,31 $\pm 3,2$	21,69 $\pm 3,56$	-1,37 $\pm 4,11$	18,86 $\pm 1,06$
CD8 $\alpha\alpha$ ⁺	0 $\pm 0,27$	-1,56 $\pm 0,18$	0,92 $\pm 0,65$	-1,39 $\pm 0,04$	0,56 $\pm 0,88$	-1,31 $\pm 0,18$	1,31 $\pm 0,47$	-1,52 $\pm 0,06$
CD8 $\alpha\beta$ ⁺	0 $\pm 1,69$	11,37 $\pm 0,59$	0,3 $\pm 1,87$	10,15 $\pm 0,41$	-2,3 $\pm 4,43$	9,41 $\pm 1,88$	-1,7 $\pm 2,62$	11,24 $\pm 0,36$
CD4 ⁺ CD8 ⁻	0 $\pm 0,51$	9,36 ± 2	-0,8 $\pm 1,41$	6,8 $\pm 1,21$	2,27 $\pm 1,74$	8,47 $\pm 2,9$	0,91 $\pm 0,35$	5,71 $\pm 0,83$
CD4 ⁺ CD8 ⁺	0	18,43	-1,84	16,68	-0,68	20,87	-0,47	18,16

	±0,68	±3,22	±0,4	±1,94	±0,6	±3,08	±1,1	±1,57
	0	6,91	2,23	3,81	2	3,87	0,11	4,33
CD4 ⁺ CD8 ⁺	±1,44	±3,13	±2,18	±0,96	±4,05	±2,03	±3,41	±1,32
	0	-2,51	2,77	-2,61	1,01	-2,24	0,06	-2,55
CD4 ⁺ CD8αα ⁺	±0,57	±0,14	±0,96	±0,03	±1	±0,19	±0,58	±0,02
	0	-1,71	0,84	-1,21	0,94	-1,32	1,78	-1,49
CD4 ⁺ CD8αα ⁺	±0,34	±0,11	±0,76	±0,03	±1,35	±0,29	±0,57	±0,11
	0	2,5	-2,77	2,6	-1,03	2,23	-0,07	2,54
CD4 ⁺ CD8αβ ⁺	±0,57	±0,14	±0,96	±0,02	±1	±0,2	±0,57	±0,03
	0	1,71	-0,83	1,23	-0,91	1,34	-1,76	1,49
CD4 ⁺ CD8αβ ⁺	±0,34	±0,11	±0,77	±0,03	±1,35	±0,29	±0,56	±0,11
	0	22,37	-1,36	11,55	-7,61	19,74	-4,5	15,21
CD28 ⁺ CD4 ⁺	±2,01	±5,6	±1,84	±2,43	±1,51	±4,64	±1,42	±3,71
	0	-22,37	1,36	-11,55	7,61	-19,74	4,5	-15,21
CD28 ⁺ CD4 ⁺	±2,01	±5,6	±1,84	±2,43	±1,51	±4,64	±1,42	±3,71
	0	2,44	4,01	-5,22	1,07	-1,3	-0,01	-2,2
CD28 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	±1,38	±2,88	±2,42	±2,25	±1,52	±3,82	±0,86	±3,38
	0	-2,44	-4,02	5,22	-1,07	1,31	0,01	2,2
CD28 ⁻ CD4 ⁺ CD8 ⁻	±1,38	±2,88	±2,43	±2,25	±1,52	±3,82	±0,86	±3,38
	0	19,49	11,94	16,16	6,69	25,99	3,3	20,09
CD28 ⁺ CD8αα ⁺	±2,12	±11,82	±2,87	±5,24	±4,69	±5,77	±2,56	±5,11
	0	53,79	1,49	50,87	-5,3	54,39	-2,37	52,53
CD28 ⁺ CD8αβ ⁺	±1,65	±3,05	±2,31	±3,23	±1,25	±2,43	±1,93	±0,62
	0	-33,77	-11,94	-16,16	-6,69	-25,99	-3,3	-20,09
CD28 ⁻ CD8αα ⁺	±2,12	±11,89	±2,87	±5,24	±4,69	±5,77	±2,56	±5,11
	0	-53,79	-1,49	-50,87	5,3	-54,39	2,37	-52,53
CD28 ⁻ CD8αβ ⁺	±1,65	±3,06	±2,31	±3,23	±1,25	±2,43	±1,93	±0,62
	0	33,17	-1,67	24,12	-2,29	32,33	-1,22	31,96
CD4 ⁺ CD25 ⁺	±1,97	±7,37	±0,48	±3,42	±0,94	±8,76	±1,15	±5,72
	0	-2,49	30,74	7	3,26	9,4	20,69	5,17
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD44 ⁺	±3,48	±4,4	±1,88	±6,53	±3,83	±3,45	±3,03	±2,66
	0	15,17	-1,04	12,04	0,34	15,71	-1,98	14,97
ChT1 ⁺	±0,54	±1,99	±0,63	±2,23	±0,46	±4,33	±0,38	±1,17

Fonte: (CALEFI, 2016)

Tabela 19 - Média ± erro padrão das porcentagens de fenótipos TCRγδ⁺ e TCRγδ⁻ circulantes

	C	C/HS35	Ei	Ei/HS35	Cp	Cp/HS35	Ei+Cp	Ei+Cp/HS35
	0	-4,25	3,22	-3,37	2,44	-4,84	3,06	-4,88
TCRγδ ⁺ CD4 ⁺ CD8αα ⁺	±0,77	±0,35	±1,36	±0,76	±0,63	±0,14	±0,85	±0,12
	0	4,24	-3,23	3,36	-2,44	4,83	-3,09	4,89
TCRγδ ⁺ CD4 ⁺ CD8αβ ⁺	±0,76	±0,36	±1,36	±0,76	±0,63	±0,13	±0,84	±0,12
	0	-19,07	13,1	-16,78	5,4	-18,73	10,68	-19,89
TCRγδ ⁺ CD4 ⁻ CD8αα ⁺	±3,69	±0,81	±3,08	±1,94	±1,86	±1,69	±2,16	±0,59
	0	19,07	-13,1	16,78	-5,4	18,73	-10,69	19,89
TCRγδ ⁺ CD4 ⁻ CD8αβ ⁺	±3,69	±0,81	±3,08	±1,93	±1,86	±1,69	±2,16	±0,6
	0	-17,06	-2,71	19,93	-4,76	-7,14	15,49	-19,76
TCRγδ ⁻ CD4 ⁺ CD8αα ⁺	±14,48	±4,4	±14,51	±16,11	±14,87	±14,28	±17,54	±4,19
	0	17,06	2,71	-22,31	4,76	7,14	-15,49	19,76
TCRγδ ⁻ CD4 ⁺ CD8αβ ⁺	±17	±13,42	±17,41	±15,16	±17,98	±17,82	±17,7	±13,82
	0	-45,58	3,2	-11,89	6,86	-46,08	7,76	-42,61
TCRγδ ⁻ CD4 ⁻ CD8αα ⁺	±10,16	±3,93	±14,12	±12,24	±7,57	±3,26	±4,6	±4
	0	45,59	-17,48	11,89	-6,86	46,07	-7,76	42,61
TCRγδ ⁻ CD4 ⁻ CD8αβ ⁺	±10,16	±3,93	±9,67	±12,24	±7,57	±3,26	±4,6	±4
	0	-17,06	-2,71	19,93	-4,76	-7,14	15,49	-19,76
TCRγδ ⁻ CD4 ⁺ CD8αα ⁺	±14,48	±4,4	±14,51	±16,11	±14,87	±14,28	±17,54	±4,19
	0	-4,25	3,22	-3,37	2,44	-4,84	3,06	-4,88
TCRγδ ⁺ CD4 ⁺ CD8αα ⁺	±0,77	±0,35	±1,36	±0,76	±0,63	±0,14	±0,85	±0,12

	0	4,24	-3,23	3,36	-2,44	4,83	-3,09	4,89
TCR $\gamma\delta^+$ CD4 $^+$ CD8 $\alpha\beta^+$	$\pm 0,76$	$\pm 0,36$	$\pm 1,36$	$\pm 0,76$	$\pm 0,63$	$\pm 0,13$	$\pm 0,84$	$\pm 0,12$
	0	-19,07	13,1	-16,78	5,4	-18,73	10,68	-19,89
TCR $\gamma\delta^+$ CD4 $^-$ CD8 $\alpha\alpha^+$	$\pm 3,69$	$\pm 0,81$	$\pm 3,08$	$\pm 1,94$	$\pm 1,86$	$\pm 1,69$	$\pm 2,16$	$\pm 0,59$
	0	19,07	-13,1	16,78	-5,4	18,73	-10,69	19,89
TCR $\gamma\delta^+$ CD4 $^-$ CD8 $\alpha\beta^+$	$\pm 3,69$	$\pm 0,81$	$\pm 3,08$	$\pm 1,93$	$\pm 1,86$	$\pm 1,69$	$\pm 2,16$	$\pm 0,6$

Fonte: (CALEFI, 2016)

Tabela 20- Médias erro padrão das médias dos fenótipos de leucócitos esplênicos

	C	C/HS35	Ei	Ei/HS35	Cp	Cp/HS35	Ei+Cp	Ei+Cp/HS35
	0	-0,34	0,05	-0,24	0,2	-0,35	0,22	-0,29
Bu1 $^+$	$\pm 0,09$	$\pm 0,03$	$\pm 0,07$	$\pm 0,05$	$\pm 0,1$	$\pm 0,03$	$\pm 0,05$	$\pm 0,05$
	0	-0,67	-0,74	1,51	1,05	0,69	2,1	1,24
Heterófilos	$\pm 0,26$	$\pm 0,54$	$\pm 0,3$	$\pm 1,08$	$\pm 0,62$	$\pm 0,54$	$\pm 1,2$	$\pm 0,73$
	0	-7,09	-1,49	-12,31	0,19	-15,64	-0,27	-10,79
Kull $^+$	$\pm 4,8$	$\pm 5,22$	$\pm 2,9$	$\pm 4,52$	$\pm 3,93$	$\pm 2,96$	$\pm 2,09$	$\pm 3,55$
	0	0,16	0,37	0,93	4,2	1,76	4,03	1,3
Kull $^+$ MHCII $^+$ high	$\pm 0,08$	$\pm 0,1$	$\pm 0,26$	$\pm 0,27$	$\pm 1,2$	$\pm 0,65$	$\pm 1,07$	$\pm 0,34$
	0	-2,1	-0,29	-1,05	-4,27	-2,9	-4,3	-1,76
Kull $^+$ MHCII $^+$ low	$\pm 0,51$	$\pm 0,66$	$\pm 0,48$	$\pm 0,69$	$\pm 1,12$	$\pm 0,96$	$\pm 1,14$	$\pm 0,72$
	0	24,16	10,41	20,94	4,07	19,67	4,54	19,34
TCR1 $^-$	$\pm 6,65$	$\pm 3,92$	$\pm 3,43$	$\pm 6,8$	$\pm 1,98$	$\pm 4,62$	$\pm 2,67$	$\pm 4,7$
	0	-24,16	-10,41	-20,94	-4,07	-19,67	-4,54	-19,34
TCR1 $^+$	$\pm 6,65$	$\pm 3,92$	$\pm 3,43$	$\pm 6,8$	$\pm 1,98$	$\pm 4,62$	$\pm 2,67$	$\pm 4,7$
	0	15,12	-1,87	17,86	-1,07	15,72	-3,2	16,04
TCR1 $^+$ CD4 $^+$ CD8 $^-$	$\pm 2,02$	$\pm 0,96$	$\pm 0,95$	$\pm 2,59$	$\pm 1,27$	$\pm 0,85$	$\pm 0,58$	$\pm 1,57$
	0	16,2	-0,65	6,39	-3,1	10,3	-1,69	11,25
TCR1 $^+$ CD4 $^+$ CD8 $^+$	$\pm 2,11$	$\pm 4,77$	$\pm 1,51$	$\pm 2,77$	$\pm 0,51$	$\pm 2,08$	$\pm 1,02$	$\pm 1,99$
	0	-1,18	0,72	1,12	0,25	-0,28	0,96	-0,58
TCR1 $^+$ CD4 $^-$ CD8 $^+$	$\pm 0,34$	$\pm 0,34$	$\pm 0,65$	$\pm 1,31$	$\pm 0,46$	$\pm 0,36$	$\pm 0,31$	$\pm 0,32$
	0	0,03	-0,27	0,14	0,11	0,07	-0,38	0,19
TCR1 $^-$ CD4 $^+$ CD8 $^-$	$\pm 0,1$	$\pm 0,13$	$\pm 0,12$	$\pm 0,13$	$\pm 0,18$	$\pm 0,1$	$\pm 0,06$	$\pm 0,12$
	0	0,01	0	0	-0,01	0	0	0
TCR1 $^-$ CD4 $^+$ CD8 $^+$	± 0	$\pm 0,01$	± 0	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	± 0	$\pm 0,01$
	0	-0,02	-0,04	0,09	-0,05	0,06	-0,03	0,01
TCR1 $^-$ CD4 $^-$ CD8 $^+$	$\pm 0,04$	$\pm 0,01$	$\pm 0,03$	$\pm 0,08$	$\pm 0,02$	$\pm 0,04$	$\pm 0,02$	$\pm 0,04$

Fonte: (CALEFI, 2016)