ATILIO SERSUN CALEFI

Avaliação do estresse térmico por calor sobre a infecção por *Clostridium*
perfringens em frangos de corte

São Paulo

2013

ATILIO SERSUN CALEFI

Avaliação do estresse térmico por calor sobre a infecção por *Clostridium perfringens* em frangos de corte

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

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. João Palermo Neto

São Paulo

2013

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.2794
FMVZ

Calefi, Atilio Sersun
Avaliação do estresse térmico por calor sobre a infecção por *Clostridium perfringens* em frangos de corte / Atilio Sersun Calefi. -- 2013.
127 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. João Palermo Neto.

1. Avian necrotic enteritis. 2. Neuroimmunomodulation. 3. Neuroimmunology.
4. Stress. I. Título.

ERRATA

CALEFI, A. S. **Avaliação do estresse térmico por calor sobre a infecção por *Clostridium perfringens* em frangos de corte**. 2013. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Página	Onde se lê	Leia-se
Ficha	1. Avian necrotic enteritis. 2. Neuroimmunomodulation.	1. <i>Clostridium perfringens</i> . 2. Enterite necrótica aviária.
catalográfica	3. Neuroimmunology. 4. Stress.	3. Neuroimunomodulação. 4. Neuroimunologia. 5. Estresse.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do estresse térmico por calor sobre a infecção por *Clostridium perfringens* em frangos de corte", protocolado sob o nº2570, utilizando 144 (cento e quarenta e quatro) frangos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Palermo Neto, 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 e foi aprovado em reunião do dia seis de fevereiro de 2013.

We certify that the Research "Evaluation of heat stress on *Clostridium perfringens* infection in broilers", protocol number 2570, utilizing 144 (one hundred, forty four) broilers, under the responsibility Prof. Dr. João Palermo Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved at the meeting on 6 February of two thousand and thirteen.

São Paulo, 14 de fevereiro de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CALEFI, Atilio Sersun

Título: Avaliação do estresse térmico por calor sobre a infecção por *Clostridium perfringens* em frangos de corte

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

Data: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico esta dissertação:

Aos meus pais por todo carinho e apoio durante todos esses anos, sem eles nada disso poderia acontecer.

Àqueles que me são inominados, por todo amparo durante as jornadas.

Aos meus irmãos.

Aos meus avós Attilio, Maria e Linda

.

A todos de minha família.

A Adriana de Siqueira por todo carinho e companhia, parte integrante desta luta e trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Palermo Neto pela oportunidade, orientação e apoio no desenvolvimento deste trabalho de dissertação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Projeto Temático - nº 2009/51886-3; Bolsa - nº 2012/03103-3) e ao CNPq (Projeto Universal - nº 470776/2009-9) pelo suporte financeiro, que permitiu a execução deste estudo.

Ao Prof. Dr. Mario Augusto Ono pela orientação durante os quatro anos de iniciação científica que foram determinantes para meu desempenho na pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Antonio José Ferreira Piantino com os apontamentos e auxílio no desenvolvimento deste projeto.

À Dra. Claudete Astolfi Ferreira pelo apoio nas discussões metodológicas.

A Profa. Cristina Massoco pelo auxílio neste ano de trabalho.

A Prof. Dr. Silvana Lima Gorniák, chefe do Programa de Patologia Experimental e Comparada, pelo apoio na concretização desta defesa.

Aos professores da banca examinadora desta dissertação deixo minha gratidão

Ao amigo Bruno Honda por todo apoio no desenvolvimento dos projetos.

Aos amigos Carolina Costola, Lilian e Juliana pela participação ativa e invicta nos experimentos.

Ao pessoal da biblioteca pela ajuda na formatação da dissertação.

Ao Wanderley pelo trabalho na formação deste grupo de neuroimunomodulação em frangos.

Aos técnicos laboratoriais Luciano, Herculano, Claudio, Wagner e Nicolle.

Aos amigos: Wilma, Felipe, Igor, Amanda, Andressa, Bruna M., Bruna B., José Luis, Mônica, Ana Paula, Willian, Thais Frias, Thais Zanatta, Donizete, Gabriela, Aline

Amaral, Tatiana, Rafaela.

Aos amigos e colegas da Pós-graduação: Rodrigo, Thiago Aloia, Milena, Viviane, João Gimenes, Adriano, Thalita, Aline Ameni, Ana Paula, Daniel Sanches, Denise, Tieme, Daniel Cohn, Laisa, Gullherme, e a todos aqueles que minha memória falha deixou de citar.

RESUMO

CALEFI, A. S. **Avaliação do estresse térmico por calor sobre a infecção por *Clostridium perfringens* em frangos de corte.** [Evaluation of heat stress on *Clostridium perfringens* infection in broiler chickens]. 2013. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O setor avícola apresenta o maior crescimento em volume produzido dentre todos os setores cárneos no Brasil. A grande participação dos produtos avícolas na alimentação humana somada ao risco do desenvolvimento de resistência bacteriana, levaram a União Européia (UE) a abolir utilização de antimicrobianos como aditivos e de forma profilática na ração de animais. A remoção dos aditivos associada ao sistema de criação intensivo acabaram por fazer que doenças, até então consideradas controladas, se tornassem reemergentes. A enterite necrótica aviária (NE) é considerada um exemplo. De forma geral, condições estressoras predispoem ao desenvolvimento de doenças, sendo o calor um dos estressores mais comuns que ocorrem em granjas aviárias. Este estudo enfoca o efeito do estresse térmico por calor ($35\pm 1^{\circ}\text{C}$) sobre o desenvolvimento da NE em frangos de corte. Para isso, 60 frangos de corte machos foram divididos em 6 grupos experimentais: 1 – Grupo Controle; 2 – Grupo Controle Estressado (C/HS35); 3 – Grupo Tioglicolato (T); 4 – Grupo Tioglicolato Estressado (T/HS35); 5 – Grupo Infectado (I); 6 – Grupo Infectado Estressado (I/HS35). A infecção experimental com *Clostridium perfringens* foi feita por via oral, com a bactéria em meio de cultura misturada a ração, do 15º ao 21º dia de vida nos grupos I e I/HS35. O estresse por calor ($35\pm 1^{\circ}\text{C}$) foi realizado do 14º ao 21º dia de vida das aves dos grupos estressados. Durante todo período experimental os animais foram mantidos em isoladores. Em relação aos animais não estressados, os animais submetidos ao estresse por calor apresentaram: 1- menor escore lesional macro e microscópico no intestino delgado; 2- maior concentração de IgA no lavado intestinal do duodeno; 3 - menor concentração de IgA no jejuno; 4 - redução dos níveis séricos de IgA e IgY; 5 - maior concentração sérica de IgM; 6 - diminuição qualitativa evidente dos heterofilos intestinais em relação aos animais infectados e estressados. Portanto, mostrou-se que o estresse por calor apresentou efeito imunomodulador importante, ao reduzir a inflamação intestinal. Este achado associa-se provavelmente à diminuição da imunidade inata por redução

da migração de heterófilos para a mucosa intestinal, desta forma prevenindo a manifestação de um quadro clínico mais grave de NE, fato associado à diminuição das lesões desencadeadas pelo processo inflamatório heterofílico.

Palavras-chave: *Clostridium perfringens*. Enterite necrótica aviária. Neuroimunomodulação. Neuroimunologia. Estresse.

ABSTRACT

CALEFI, A. S. **Evaluation of heat stress on *Clostridium perfringens* infection in broiler chickens**. [Avaliação do estresse térmico por calor sobre a infecção por *Clostridium perfringens* em frangos de corte]. 2013. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The poultry sector presented the highest growth in the volume of production among all meat sectors in Brazil. The great participation of poultry products on human diet together with the risk of food and environmental contamination by resistant bacteria led the European Union (EU) countries to abolish the use of antibiotics as feed additives in animal production. This fact associated with the intensive farming system are being reported as responsible for the re-emergence of some already controlled diseases. The avian necrotic enteritis (NE) exemplify such an effect. Generally, stressful conditions are predisponent factors for disease development; heat stress is one of the most common stressor in poultry farms. This study focuses on the effects of heat stress (35 ± 1 °C) on the development of NE in broilers. For this purpose, 60 male broilers were divided into 6 groups: 1 - control group, 2 - stressed control group (C/HS35) 3 - thioglycolate group (T) 4 - thioglycolate stressed group (T/HS35); 5 - infected group (I) 6 - infected stressed group (I/HS35). Experimental infection with *Clostridium perfringens*, grown in thioglycollate broth medium, was given through the feed to the birds of groups I and I/HS35 from the 15th to 21st days of life. The heat stress (35 ± 1 °C) was induced continuously from the 14th to the 21st day of life in birds of the stressed groups. Throughout the experimental period the animals were kept in isolators. Compared to non-stressed animals, broilers subjected to heat stress showed: lower gross and microscopic score lesions in the small intestine; increased concentrations of IgA in duodenal lavage and decreased IgA concentrations in the jejunum; smaller concentrations of serum IgA and IgY; increased concentration of serum IgM; reduction in gut number of heterophils in the thioglycolate treated and in the infected groups. Therefore, this experimental model showed that heat stress presented a significant immunomodulatory role on the induced NE, most probably because it reduced intestinal inflammation via decrease in heterophils migration to

the intestinal mucosa, which in turn might had reduced tissue damage during infamation, hence preventing the development of a more severe form of NE.

Keywords: *Clostridium perfringens*. Avian necrotic enteritis.
Neuroimmunomodulation. Neuroimmunology. Stress.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre a média do peso corporal dos animais.....	60
Tabela 2 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre a média do peso relativo do baço dos animais	61
Tabela 3 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre a média do peso relativo da Bursa de Fabricius dos animais	62
Tabela 4 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre a média da concentração de corticosterona sérica nos diferentes grupos.	85
Tabela 5 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre a média da concentração sérica de IgA nos animais	87
Tabela 6 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre a média da concentração sérica de IgM nos animais	88
Tabela 7 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre a média da concentração sérica de IgY nos animais	89
Tabela 8 - Efeito dos tratamentos experimentais sobre os níveis de IgA no lavado do duodeno	91
Tabela 9 - Efeito dos tratamentos experimentais sobre os níveis de IgA no lavado do jejuno	92

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema do manejo alimentar dos grupos C e C/HS35	49
Figura 2 - Esquema do manejo alimentar dos grupos T, T/HS35, I e I/HS35	50
Figura 3 - Esquema do estresse por calor dos grupos C/HS35, T/HS35 e I/HS35 ...	52
Figura 4 - Efeito dos tratamentos e estresse por calor sobre o peso corporal dos animais.....	59
Figura 5 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre o peso relativo do baço dos animais.....	61
Figura 6 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre o peso relativo da Bursa de Fabricius dos animais.....	62
Figura 7 - Fotomicrografia de baço (A) e Bursa de Fabricius (B) de animais controles, aumento de 40x. Coloração HE.....	63
Figura 8 - Fotografia macroscópica de animais que receberam tioglicolato na alimentação.....	64
Figura 9 - Fotografia macroscópica mostrando toda a extensão da mucosa do intestino de animais do grupo T (B) e grupo I (A)	65
Figura 10 - Fotografia macroscópica de secções dos duodenos, jejuno e íleo dos animais sobre a mesa para avaliação anatomopatológica	65
Figura 11 - Fotografia macroscópica de porções do duodeno.....	67
Figura 12 - Fotografia macroscópica do intestino de animais infectados.....	67
Figura 13 - Fotografias macroscópicas intestinais de animais infectados.....	68
Figura 14 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre o escore lesional macroscópico no duodeno dos animais infectados estressados	68
Figura 15 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre o escore lesional macroscópico no jejuno dos animais infectados.....	69
Figura 16 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre o escore lesional macroscópico no íleo dos animais infectados	70
Figura 17 - Fotomicrografias representativas do duodeno das aves	74
Figura 18 - Fotomicrografias representativas dos vilos do duodeno das aves.....	75
Figura 19 - Fotomicrografias representativas das criptas do duodeno das aves	76
Figura 20 - Fotomicrografia de infiltrado linfoplasmocitário e polimorfonuclear no duodeno de frango de corte	77

Figura 21 - Fotomicrografia de infecção bacteriana no intestino de ave submetida a infecção por <i>C. perfringens</i>	77
Figura 22 - Fotomicrografias do duodeno das aves para avaliação da produção de muco neutro	78
Figura 23 - Fotomicrografia para visualização de bactérias aderidas aos vilos	79
Figura 24 - Fotomicrografia de duodeno de ave infectada	79
Figura 25 - Fotomicrografias representando produção de muco ácido no duodeno das aves.....	80
Figura 26 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre o escore lesional microscópico no duodeno dos animais	81
Figura 27 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre o escore lesional microscópico no jejuno dos animais.....	82
Figura 28 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre o escore lesional microscópico no íleo dos animais	83
Figura 29 - Fotomicrografia do intestino submetido a técnica imunoistoquímica para identificação de linfócitos e plasmócitos	84
Figura 30 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre os níveis plasmáticos de corticosterona dos animais.....	86
Figura 31 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre os níveis plasmáticos de IgA nos diferentes grupos	87
Figura 32 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre os níveis plasmáticos de IgM nos diferentes grupos	88
Figura 33 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre os níveis plasmáticos de IgY nos diferentes grupos	89
Figura 35 - Efeito dos tratamentos experimentais sobre os níveis de IgA no lavado do jejuno dos diferentes grupos	91
Quadro 1 - Critérios para determinação do escore macroscópico do intestino delgado dos animais	52
Quadro 2 - Critérios para determinação do escore microscópico do intestino dos animais.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA –	6-hidroxidopamina
ACTH –	Hormônio Adrenocorticotrófico
ANOVA –	Análise de Variância
BHI –	Infusão de cérebro e coração
C –	Grupo controle
C/HS35 –	Grupo controle estressado por calor
CD –	Grupamento de diferenciação
CRH –	Hormônio liberador de corticotrofina
ELISA –	Ensaio imunoenzimático
GH –	Hormônio do crescimento
GABA –	Ácido gaba-aminobutírico
GALT –	Tecido linfóide associado a mucosa
HE –	Hematoxilina e Eosina
HHa –	Hipotálamo-hipófise-adrenal
HHT –	Hipotálamo-hipófise-tireóide
I –	Grupo infectado
I/HS35 –	Grupo infectado estressado por calor
IgA –	Imunoglobulina A
IEL –	Linfócito interendotelial
IFN –	Interferon
IGF –	Fator de crescimento semelhante a insulina
IL -	Interleucina
IgM –	Imunoglobulina M
IgY –	Imunoglobulina Y
LPS -	Lipopolissacarídeo
MHC –	Complexo de histocompatibilidade
MFT –	Meio fluido tioglicolato
MCC –	Meio de carne cozida
NE –	Enterite necrótica
NF –	Fator nuclear
NK –	Linfócito <i>Natural Killer</i>
PB –	Proteína bruta

PAS –	Ácido perclórico-Schiff
PBS –	Tampão fosfato-salino
PCR –	Reação em cadeia da polimerase
PRR –	Receptor de reconhecimento de padrões
PAMPs –	Padrões moleculares associados a patógenos
PVN –	Núcleo paraventricular do hipotálamo
SNAP –	Sistema nervoso autônomo parassimpático
SNAS –	Sistema nervoso autônomo simpático
SNC –	Sistema nervoso central
SN –	Sistema nervoso
SI –	Sistema imune
T –	Grupo tioglicolato
T/HS35 –	Grupo tioglicolato estressado por calor
T ₃ -	Triiodotironina
T ₄ -	Tiroxina
TCR –	Receptor de células T
TLR –	Receptor semelhante ao <i>Toll</i>
Th1 –	Linfócito T auxiliar tipo 1
Th2 –	Linfócito T auxiliary tipo 2
TRH –	Hormônio liberador de tireotrofina
TSH –	Hormônio estimulador da tireóide
TNF –	Fator de necrose tumoral
UE –	União européia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	Neuroimunomodulação	22
2.2	Enterite Necrótica Aviária.....	32
2.3	Sistema Imune e Intestino	37
2.4	Estresse por Calor	41
2	OBJETIVOS	46
2.1	Objetivo geral:	46
2.2	Objetivos específicos:	46
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1	Animais	47
4.2	Determinação dos grupos	47
4.3	Manejo alimentar	48
4.3.1	Manejo alimentar dos grupos C e C/HS35.....	48
4.3.2	Manejo alimentar dos grupos T, T/HS35, I e I/HS35	49
4.4	Preparo do inócuo e protocolo de infecção	50
4.5	Estresse por calor	51
4.6	Coleta de sangue	52
4.7	Avaliação macroscópica intestinal	52
4.8	Cultura bacteriológica	54
4.9	Quantificação de IgA intestinal	54
4.10	Quantificação dos níveis séricos de corticosterona	54
4.11	Quantificação dos níveis séricos de imunoglobulinas	55
4.12	Exame anatomopatológico intestinal	55
4.13	Exame anatomopatológico de baço e bursa de Fabricius	56
4.14	Análise imunoistoquímica de linfócitos B no intestino delgado	57
4.16	Análise estatística.....	57
5	RESULTADOS	58
5.1	Protocolo de cultivo de <i>C. perfringens</i>	58
5.2	Protocolo de infecção experimental em frangos de corte por <i>C. perfringens</i>	58

5.3	Avaliação do peso dos animais e peso relativo de baço e bursa de Fabricius das aves	58
5.4	Avaliação microscópica do baço e da bursa de Fabrícus das aves.....	62
5.5	Avaliação macroscópica do proventrículo e da moela das aves	63
5.6	Avaliação macroscópica do intestino delgado das aves	64
5.7	Avaliação microscópica do intestino delgado das aves	70
5.8	Imunoistoquímica para identificação de linfócitos B no intestino delgado (duodeno e jejuno)	83
5.9	Quantificação dos níveis séricos de corticosterona	85
5.10	Quantificação dos níveis séricos de IgA, IgM e IgY	86
5.11	Quantificação dos níveis de IgA no lavado intestinal	89
4	DISCUSSÃO	93
6	CONCLUSÕES	108
	REFERÊNCIAS	110

1 INTRODUÇÃO

Segundo índices da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), em 2011 foram produzidos aproximadamente 294 milhões de toneladas de carne no mundo, o que representou um aumento de 1,1% em relação à produção do ano de 2010. Nesse panorama mundial, a carne de frango ocupou o terceiro lugar em volume produzido, com crescimento de 6,8% em relação ao ano anterior (UBABEF, 2012); o consumo *per capita* de carne de frango atingiu a marca de 47,7 Kg, o maior até o momento. Em 2011 a produção de carne de frango foi a que apresentou o maior crescimento no setor cárneo, atingindo a marca de 13 mil toneladas. Deste modo, o Brasil se aproximou do segundo maior produtor de carne de frango, a China, com 13,2 mil toneladas. Estima-se que o Brasil continue a apresentar o maior crescimento mundial na produção de carne de frango nos próximos anos em decorrência do aumento do preço e queda na demanda da carne bovina (FAO, 2012).

Como tentativa de suprir esse mercado crescente, tem sido enfatizada a necessidade de produzir em grande quantidade e a baixo custo, o que implica numa maior preocupação com o melhoramento animal e com as técnicas de manejo de forma tal a obter animais mais precoces e com alta taxa de ganho de peso. Neste contexto, a aplicação desses sistemas produtivos superintensivos faz com que os animais sejam levados ao seu limiar de homeostasia. Como consequência, um manejo focado em precocidade pode ser impactante ao bem estar animal ocasionando prejuízos econômicos, em especial, ao provocar estresse e desequilíbrios gastrointestinais nos animais, culminando estes fatos com retardo de crescimento e/ou aparecimento de doenças, em especial, infecciosas (HUMPHREY, 2006).

Nas últimas décadas, tem-se observado o uso sistemático de aditivos antimicrobianos em produção de aves e suínos não apenas para incrementar o ganho de peso, mas também para compensar eventuais perdas de crescimento decorrentes dos processos infecciosos gastrintestinais e deficiências de manejo apontados acima. Este uso intensivo tem sido associado ao desenvolvimento de resistência bacteriana e à eventual presença de resíduos de antimicrobianos acima

dos limites permitidos em alimentos fatos que, representam riscos à saúde humana (WITTE, 1998; HAMSCHER et al., 2003). Para evitar estes riscos, a União Europeia adotou uma atitude de prevenção, banindo o uso de antibióticos como aditivos na ração dos animais. Em consequência, doenças como a enterite necrótica aviária (NE) tornaram-se reemergentes nos países europeus. Estima-se que a perda mundial devido à enterite necrótica subclínica supere a casa dos U\$ 2 bilhões (SLUIS, 2000).

NE é uma doença que acomete aves de produção de 2 a 6 semanas de vida; possui distribuição mundial tendo sido descrita pela primeira vez por Parish em 1961. Seu agente etiológico primário é o *Clostridium perfringens*, uma bactéria gram positiva, toxigênica, formadora de esporos e de crescimento anaeróbico. Sendo encontrada facilmente no ambiente, é constituinte natural da microbiota intestinal das aves. Os principais sinais clínicos da NE são diarreia e desenvolvimento de necrose da mucosa intestinal. O principal fator em sua etiopatogênia é a liberação de toxinas pela bactéria. Atualmente, foram isoladas 17 diferentes frações tóxicas. A principal fração é chamada de alfa toxina, uma metaloproteinase capaz de desencadear alterações na membrana celular, alterando a relação espacial das células por atuar nas junções ocludentes dos enterócitos (DAHIYA et al., 2006).

Através de experimentos com *C. perfringens* tipo A em aves observou-se que a infecção realizada por via oral e de forma isolada, mantendo-se as condições ambientais e de manejo ideais, não produzia os sinais clínicos da NE. Por outro lado, a associação de alimentação desbalanceada, coinfeção com coccidioses e adição de alguns fatores estressores foram relatados como sendo capazes de desencadear a doença (HELMBOLDT, 1971; AL-SHEIKHLY, 1977; COWEN et al., 1987; CRAVEN, 2000; WILLIAMS et al., 2003).

O estresse é um dos principais fatores limitantes na produção de aves (HUMPHREY, 2006). Dessa forma, é preocupação não somente na NE, mas em toda cadeia de produção animal, visto que comprovou-se sua relação com uma queda nos parâmetros zootécnicos dos animais como, por exemplo, peso, conversão alimentar e taxas reprodutivas (MASHALY et al., 2004; QUINTEIRO-FILHO et al., 2010, 2012)

Os estudos conduzidos sobre estresse iniciaram-se com o trabalho pioneiro do pesquisador Hans Selye (1936) que analisou os efeitos de uma diversidade de

agentes nocivos em ratos, observando o desenvolvimento de uma síndrome chamada, na época, de “Síndrome de Adaptação Geral”. 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. Designa-se de 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. Em curto prazo, a reação ao estímulo é geralmente adaptativa; no entanto, se o estímulo persiste, sua cronicidade desencadeia efeitos graves.

Com o avanço da pesquisa, um novo campo se abriu: a neuroimunologia ou psiconeuroimunologia, uma ciência que se ocupa em desvendar as delicadas relações bidirecionais existentes entre os sistemas nervoso, imune e endócrino (ADER; COHEN; FELTEN, 1995).

Neste contexto, é importante ressaltar que fatores ambientais, estado nutricional, fisiológico e social podem gerar estresse em animais. De fato, frangos submetidos a estímulos estressores por um período prolongado de tempo apresentaram queda no ganho de peso e no consumo de ração, sendo até mesmo observada morte de alguns animais (QUINTEIRO-FILHO et al., 2010, 2012). O calor é um tipo particular e relevante de estressor ambiental. As altas temperaturas ambientais, além de causarem desconforto físico, produzem transtornos fisiológicos e produtivos (QUINTEIRO-FILHO et al., 2010).

Considerando-se ser o Brasil um país sub-tropical, 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 reversão de eventuais alterações desencadeadas pelo calor, em especial na mucosa intestinal e microbiota dos animais. Dentre estas, ganha especial atenção a NE, uma vez que o estresse por calor pode desencadear o aparecimento de doenças. Assim, parece-nos relevante avaliarmos neste trabalho e através de uma abordagem neuroimune os efeitos do estresse por calor em aves infectadas por *C. perfringens* tipo A.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neuroimunomodulação

Desde os primórdios da humanidade nota-se a preocupação constante do ser humano com a manutenção da saúde. A humanidade vem buscando por conhecimentos que contribuam para uma melhor qualidade de vida. Uma vez estabelecido um desequilíbrio orgânico, seja ele fruto de uma alteração transitória ou de uma de doença persistente, faz parte da natureza humana a busca pela sua cura, associando-a em muitos casos, à causa que a gerou (MINAYO, 1988).

Mesmo na vigência dessa curiosidade com a teleologia das doenças, a ciência precisou caminhar muitos anos no escuro para iniciar suas grandes descobertas. No princípio, permaneceu a especulação ou a observação do aspecto macroscópico de uma enfermidade para se inferir o que se desenrolaria no âmbito microscópico. Alterações comportamentais foram associadas a sintomas ou tomadas como um alerta para o aparecimento de enfermidades. De forma intuitiva, essas associações levaram muitas doenças a serem atribuídas a uma “crise de nervos” (TRAVERSO-YÉPEZ; MEDEIROS, 2004).

Permaneceu por muitos anos a sacralização do corpo na Idade Média, proibindo-se a dissecação em Anatomia e Patologia. Neste contexto, a religião influenciou de forma direta no caminhar dos estudos científicos, por considerar, o corpo humano como sagrado e as tentativas de conhecê-lo foram, por muito tempo, infrutíferas, e cobertas por espesso véu. Em contrapartida, o dualismo corpo-alma era debatido desde a antiguidade por filósofos como Anaxágoras, Platão e Aristóteles e, até por representantes religiosos. Desta forma, a divisão entre a *soma* e a *psique*, moldou a compreensão das doenças (MOREIRA, 2003), ou seja, algumas doenças eram associadas como um distúrbio da *psique* enquanto que outras, não. Desta forma, inferiu-se que uma alteração do estado mental poderia desencadear uma doença física (MINAYO, 1988).

Naquela época não se fazia uma diferença clara entre os sistemas nervoso e imune, e eles eram tratados muitas vezes como sistemas idênticos. Com o passar

dos anos e com o advento das ciências ligadas ao estudo das doenças infecciosas, observou-se que, após o desenvolvimento de uma doença específica, uma pessoa tornava-se resistente a ela isto é, ela se tornava imune, palavra derivada do latim *immunis*, que significa “isento” (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Estas observações foram importantes para a criação das vacinas e, consequente, para o estudo e caracterização do sistema imune como uma entidade isolada, em especial, do sistema nervoso.

No final do século XIX acreditava-se que o sistema nervoso era o desencadeador da resposta anafilática. Estudos utilizando cães e suínos descerebrados identificaram que o cérebro não era o responsável pelo desenvolvimento da resposta anafilática; mesmo assim, ainda persistiu a ideia intuitiva de alguns pesquisadores da existência de uma associação entre os sistemas nervoso e imune (MOREIRA, 2003).

Mais adiante no tempo, a separação funcional do sistema imune do sistema nervoso, fizeram com que estes ramos da ciência passassem a caminhar de modo independente. O advento da biotecnologia, ao possibilitar a identificação e caracterização das células, contribuiu para esta divisão. Nesse sentido, ainda que tenham permanecido muitas dúvidas sobre a relação destes sistemas, seu estudo integrado foi quase sempre negligenciado pela academia.

Claude Bernard (1947) no início do século XIX cunhou o termo homeostase, para denominar a constância em que o meio “interior” se mantinha, o que para ele garantia o equilíbrio das funções fisiológicas de um organismo (COOPER, 2008). Para ele, desequilíbrio destas funções, por razões físicas ou psíquicas desencadeia doenças. Desta forma, o viver equilibrado, tanto física como mentalmente, era preconizado na época como muito relevante para evitar-se o desenvolvimento de doenças.

Em 1936, Hans Selye iniciou um estudo em que fazia inoculação de uma diversidade de agentes nocivos em ratos; ele observou o desenvolvimento de uma resposta estereotipada e semelhante entre os animais, independentemente do estímulo que tivesse empregado. Descreveu, ao exame necroscópico dos órgãos linfoides, 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 o que, muito tempo após, seria denominado de

“comportamento doentio” como 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 ela 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.

Besedovsky et al. (1977), verificaram através da inoculação de lipopolissacarídeo (LPS) em ratos um aumento da liberação de hormônio adrenocorticotrófico e de corticosterona, fatos concomitantes ou subsequentes a alterações de atividade elétrica de neurônios hipotalâmicos. Deste modo, através de um desafio imune mostrou uma alteração neurológica. Assim, e de outro ponto de vista, demonstrou-se a existência de relações bidirecionais imuno-neuroendócrinas e da neuroimunomodulação.

Mesmo levando-se em conta que o estresse poderia ser desencadeado por estímulos diversos provenientes do sistema nervoso, permaneciam ainda encobertos os atores psicológicos com ele envolvidos. Dada a importância da psique (emoção) sobre o corpo físico, o pesquisador Jorge Solomon (1964) cunhou pela primeira vez o termo psicoimunologia demonstrando, posteriormente em seus trabalhos, a existência de relações entre a *psique* e o cérebro com o sistema imune (SOLOMON; AMKRAUT, 1981). Estes sistemas, cada vez mais estudados em suas relações e confrontados com outros sistemas, geraram as áreas de pesquisa denominadas de: neuroimunologia, psiconeuroimunologia, psicoimunologia, neuroendocrinoimunologia. A neuroimunomodulação é parte indissociável destas áreas.

A neuroimunomodulação é 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 tomado, portanto, como um todo (ADER, 2000). Tem, portanto, visão holística.

Podemos designar como estressor qualquer estímulo (ambiental, psicológico, imunológico ou comportamental) capaz de gerar alterações fisiológicas e

comportamentais. Em curto prazo, a reação a esse estímulo é um processo adaptativo; no entanto, se o estímulo persistir no tempo desenvolvem-se distúrbios orgânicos muitas vezes graves no animal a ele submetido (DHABHAR; MCEWEN, 1997).

O termo *stress* derivou da engenharia onde ele descreve os efeitos de uma determinada força sobre um material. A utilização do termo foi discutida durante o seminário apresentado por Hans Seyle em 1946 na França. Em vista da inexistência de terminologia mais adequada na área em questão, a palavra *stress* foi adotada em diversas linguas, sendo o português um dos raros idiomas a grafá-la de forma diferente da original (estresse) (MASON, 1975; MOREIRA, 2003).

A ação do SNC sobre o SI têm sido em parte associada às atividades do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e do sistema nervoso autônomo simpático (SNS). A relação intrínseca do hipotálamo com os centros superiores o torna um centro importante de regulação das respostas adaptativas frente aos estressores. As estimulações aferentes ao SNC são integradas no hipotálamo, sendo posteriormente distribuídas às regiões específicas, ligadas às atividades do SNS e eixo HHA (BERKENBOSCH et al., 1987).

Mais especificamente, sabe-se ser a secreção de glicocorticóides dependente da ativação do eixo HHA. 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 liberação de glicocorticóides: corticosterona nos animais e cortisol em humanos (ZIEGLER; HERMAN, 2002).

A corticosterona modula de forma intensa a atividade do sistema imune (DERIJK; STERNBERG, 1994; POST; REBEL; HUURNE, 2003; SHINI et al., 2008). Em especial modula a transcrição gênica impedindo translocações de fatores para o núcleo da célula imune, sendo o principal o fator nuclear envolvido o κB (NF- κB). 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); esta alteração reflete-se em outros tipos celulares, como os polimorfonucleares que, por sua vez, modulam a liberação de outras citocinas (BAEUEERLE; BALTIMORE, 1996). Os glicocorticóides alteram o padrão de citocinas próinflamatórias (Th1) para um padrão antiinflamatório (Th2), gerando uma diminuição da resposta imune celular e uma estimulação da resposta imune humoral. Outra característica importante da corticosterona sobre o sistema imune é a capacidade que ela apresenta de diminuir a quimiotaxia e a migração das células polimorfonucleares (neutrófilos/heterófilos, eosinófilos, basófilos) para os sítios de infecção (SHINI; KAISER, 2008).

Todo sistema apresenta algum mecanismo regulador para ativação ou diminuição de sua atividade. A inibição do eixo HHA pode se dar por via dependente e independente de glicocorticoides (HERMAN; CULLINAN, 1997; KELLER-WOOD; DALLMAN, 1984). O *feedback* negativo do eixo HHA produzido pelos glicocorticóides se dá pela ligação aos receptores da membrana dos neurônios, desencadeando a ativação de genes responsáveis por inibir a transcrição do ACTH. Uma via de inibição rápida da liberação de ACTH também pode ocorrer dependente dos níveis elevados de corticosterona na circulação, porém este mecanismo ainda permanece desconhecido (KELLER-WOOD; DALLMAN, 1984; YOUNG; AKANA; DALLMAN, 1990; ZIEGLER; HERMAN, 2002).

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 prefrontal medial, hipocampo e/ou o *subiculum* ventral); estes centros modulam a transferência da informação, “identificando” a significância do estímulo periférico, que tanto pode ser estimulatório para a ativação do eixo HHA ou inibitório. A possível insignificância da informação carregada ou o excesso de estimulação central, podem inibir o PVN por sinapses GABA-glutamato, que desencadeiam a excitação de projeções inibitórias do PVN (CANTERAS; SWANSON, 1992; HERMAN; DOLGAS; CARLSON, 1998; KISHI et al., 2000). Desta forma, faz-se o *feedback* negativo do eixo HHA, que pode se dar pela estimulação de neurônios em centros neurais superiores do diencefalo (RISOLD; SWANSON, 1996; ZIEGLER; HERMAN, 2002).

A rica inervação GABAérgica do núcleo paraventricular de regiões do hipotálamo, núcleo préptico e núcleo da estria terminal sustenta a teoria do *feedback* negativo do eixo HHA independente de glicocorticoides (CULLINA; HERMAN; WATSON, 1993; ROLAND; SAWCHENKO, 1993). A presença de subunidades de receptores GABA-A no PVN corrobora com a teoria, pela 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). O SNAP, em especial, possui importante relação com mecanismos neuroimunes, que ocorrem no trato gastrintestinal; sua importância está na transmissão de estímulos aferentes viscerais, em especial dos intestinos, uma possível via de ativação do *feedback* negativo do eixo HHA (Nance e Sanders, 2007). Além disso, mostrou-se que estímulos sensoriais desencadeados por estressores resultaram na ativação do SNAS, o que culmina com a estimulação de terminações nervosas 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). A cronicidade da estimulação catecolaminérgica produz desregulação endocrina, gerando alterações circulatórias e metabólicas (MILLER, 1998). As catecolaminas alteram a produção de citocinas, com diminuição da resposta próinflamatórias (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 capaz de aumentar a inflamação e que, a interrupção do estímulo simpático para os órgãos linfáticos predispõe ao desenvolvimento de infecções (LORTON et al., 1996; MOTOBU et al., 2003).

O eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (HHT) é outra via importante de ativação durante o estresse de caráter imunomodulatório. Como se trata de uma via bidirecional, o sistema imune também é capaz de alterar as funções deste eixo. A citocina próinflamatória IL-1 suprime a liberação do hormônio estimulante da tireóide (TSH), enquanto a liberação de IL-2 estimula o eixo HHT. Os hormônios tiroxina (T₃),

triiodotironina (T_4), hormônio liberador de tirotrófina (TRH) e o hormônio estimulador da tireóide (TSH) estimulam as células do sistema imune. Experimentos realizados em ratos demonstraram interações entre os eixos HHT e HHA em animais hipotireoideos e hipertireoideos (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 anabólicos, como T_3 , T_4 e o hormônio do crescimento (GH) (HADDAD; MASHALY, 1990).

Sabe-se que o GH estimula a proliferação de linfócitos e timócitos, bem como a atividade citotóxica das células NK. A ligação deste hormônio aos receptores de linfócitos ativa a via do NF- κ B e a produção do fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1) (GEFFNER, 1997; BUUL-OFFERS; VAN 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 o estresse.

Mesmo que as áreas de estudo tendam à compartimentalização e à verticalização do conhecimento, faz-se necessária uma conexão dos sistemas neuroendócrino e imune para identificar os possíveis efeitos de uma alteração tão complexa como a induzida pelo estresse, muito especialmente em aves.

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 a neurologia ou a imunologia de aves, isto é, usavam abordagens isoladas ou isentas de interpretações neuroimunes. Pode-se dizer que um dos primeiros artigos a analisar o tema neuroimunomodulação em aves foi a revisão de Marsh e Scanes (1994). Esses autores deram ênfase à discussão das relações neuroendócrinas dos hormônios tireoidianos, do hormônio do crescimento e dos mediadores hormonais, assim como dos corticosteróides gonadais e adrenocorticais com o sistema imune de aves. Entretanto, um dos trabalhos pioneiros envolvendo o estudo das relações neuroimunes em aves, mesmo não denominando-as diretamente desta forma, foi aquele de Glick em 1984.

Como discutido anteriormente para mamíferos, os hormônios tireoidianos, o hormônio do crescimento, os corticosteóides, a prolactina, os esteróides gonadais,

dentre outros, e seus mediadores também possuem capacidade de modular o sistema imune das aves (GLICK, 1991; HADDAD; MASHALY, 1991; SKWARLO-SONTA, 1992; MASHALY, 1995; DEVICHE; DUFFY et al., 2000; TROUT; CORTEZ, 2005). Sob condições estressoras, as aves liberam a corticosterona, por mecanismo semelhante ao dos mamíferos, com a 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 por CRH de linfócitos derivados do baço de aves fez com que as células deste órgão liberassem o ACTH, sendo o sobrenadante da cultura destas células capaz de estimular *in vitro* as células da adrenal a liberar corticosterona por mecanismo dependente de tempo. Foi possível observar o mesmo processo após a estimulação de macrófagos de aves por CRH (HENDRICKS et al., 1998).

Os sistemas nervoso e imune das aves estão diretamente relacionados, já que uma lesão do hipotálamo de aves jovens comprometeu parâmetros imunes das mesmas como, por exemplo, a produção de linfócitos B e T (GLICK, 1984). 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 corticosteóides, tendo sido o crescimento do timo também associado aos hormônios tireoidianos, o que comprovava a existência de uma complexa relação neuroimunoendócrina em aves (GLICK, 1984).

A utilização de corticoides também provocava alterações imunes nas aves. O tratamento de patos com dexametasona alterou a atividade de células natural killers (NK) periféricas, o que possivelmente foi associado à modulação da produção de eucosanóides por monócitos (FOWLES et al., 1991, 1993). Diminuição da imunidade humoral também foi associado à aplicação de dexametasona em aves (FOWLES et al., 1991, 1993).

A administração exógena 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 das aves. Também mostrou-se que a aplicação de hormônios tireoidianos aumentou o peso do timo das aves (MARSH; LAUTERIO; SCANES, 1984; MARSH et al., 1984). O fornecimento de hormônios

tireoidianos 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 (CHANDRATILLEKE; HÀLA; MARSH, 1996; HADDAD; MASHALY, 1990).

A bursa de Fabricius possui 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 (PINTEA; CONSTANTINESCU; RADU, 1967; GLICK, 1991; ZENTEL; WEIHE, 1991). A bursectomia de aves com 1 dia de vida diminui a resposta *in vitro* das adrenais 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) demonstraram que a aplicação de LPS em machos de aves imaturas sexualmente gerou um aumento nos níveis de corticosterona e uma diminuição de T₃ circulante. O mesmo não ocorreu quando aplicado o antígeno T-dependente (BSA), ou seja, os efeitos encontrados estavam ligados diretamente à resposta humoral.

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

Assim sendo, os sistemas de criação intensivos, tanto de frangos de corte quanto de aves de postura, são capazes de gerar estímulos estressores, que podem ser responsáveis por desregulações endócrinas diversas e por consequente queda dos índices de produção (CUNNICK; KOJIC; HUGHES, 1994; HECKERT et al., 2002; MASHALY et al., 2004).

A análise da inervação dos órgãos linfóides reforça a noção de uma relação do sistema nervoso com o sistema imune em aves (CORDIER, 1969; PINTEA; CONSTANTINESCU; RADU, 1967). A bursa de Fabricius possui inervação peptidérgica; peptídeos relacionados ao gene da calcitonina, taquicininas e

neuropeptídeo Y são encontrados em vasos próximos da bursa. Demonstrou-se a presença de inervação simpática das artérias localizadas próximas aos folículos (ZENTEL et al., 1991). Ciriaco et al., (1995), utilizando imunoistoquímica, mostraram uma vasta presença de neurônios noradrenérgicos e também de fibras reativas à acetilcolinesterase na região perivascular da bursa; no entanto, estes autores não relataram a presença de fibras nervosas na medula dos folículos, revelaram células semelhantes às dendríticas e outras células reativas à acetilcolinesterase na região folicular. Desta forma, fica evidente o envolvimento do sistema nervoso autonômico com as funções da bursa Fabricius.

O desenvolvimento e a involução do timo e da bursa relacionam-se à produção de peptídeos derivados da pró-opiomelancortina nestes órgãos linfóides, sendo que esta proteína é precursora do ACTH hipofisário e da β -endorfina. A partir do 4º dia de vida das aves é possível detectar tais peptídeos e citocinas no timo das mesmas; 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 foliculares 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 do tecido por tecido fibroso (FRANCHINI; OTTAVIANI, 1999; HENDRICKS; MASHALY, 1998).

A denervação de aves intraovo empregando-se 6-hidroxidopamina (6-OHDA), uma neurotoxina, que destrói terminações noradrenérgicas, mostrou-se capaz de melhorar a resposta imune primária frente ao desafio com hemácias de carneiro (BC). Mostrou-se, neste sentido, que os níveis de noradrenalina estavam aumentados em pintinhos pré-imunizados com BC intraovo (BROWN-BORG; EDENS, 1992).

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 linócitos CD8+ esplênicos à injeção de noradrenalina nas aves (NE) (MOTOBU et al., 2003). Estas evidências confirmam ser a inervação simpática dos órgãos linfóides capaz de modular a atividade do sistema imune de aves.

Ensaios *in vitro* sobre migração de leucócitos circulantes e produção de anticorpos, mostraram que as monoaminas (dopamina, serotonina e NE) 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).

2.2 Enterite Necrótica Aviária

O ganho em volume e qualidade no sistema produtivo avícola depende diretamente do equilíbrio gastrointestinal dos animais. A grande parte das perdas econômicas, da redução do bem estar animal, e até mesmo, dos riscos à alimentação humana, está de alguma forma, associada às enterites. A enterite necrótica (NE) tem como agente etiológico o *Clostridium perfringens* tipo A ou tipo C. Esta doença vem aumentando nos últimos anos em criações avícolas principalmente em países da União Européia (UE) muito provavelmente associada à proibição do uso de antimicrobianos como aditivos zootécnicos melhoradores da conversão alimentar (IMMERSEEL et al., 2009). De fato, acredita-se que a proibição do uso dos aditivos antimicrobianos na UE seja uma atitude de precaução ao aumento do desenvolvimento de resistência bacteriana, o que tem propiciado a reemergência de doenças tidas até então como controladas. Neste sentido, por ser uma bactéria da microbiota indígena das aves, o clostrídio pode desenvolver-se descontroladamente em consequência de diminuição da imunidade ou de desequilíbrios da microbiota. Estes fatores têm sido associados a problemas de manejo, seja por desbalanço alimentar ou submissão ainda que involuntária dos animais a condições estressantes. Ou seja, o uso de antimicrobianos tem, de certa forma, compensado possíveis falhas de manejo e sua proibição como aditivo, tem sido associada diretamente ao retorno da NE na avicultura européia (GRAVE et al., 2004).

Estima-se que as perdas com NE subclínica sejam superiores a US\$ 2 bilhões anualmente (SLUIS, 2000). Esta estimativa mundial preocupa o setor avícola brasileiro, já que o Brasil permanece como o maior exportador mundial de carne de frango (UBA, 2012). As perdas geradas pela NE têm sido associadas ao desenvolvimento subclínico da doença, refletindo este fato no crescimento das aves e na conversão alimentar das mesmas. A forma clínica da doença, gera quedas

produtivas acentuadas em decorrência do aumento da mortalidade dos animais (LOVLAND; KALDHUSDAL, 2001).

Além das perdas econômicas que têm sido associadas à doença, a NE apresenta-se como importante fator de risco à Saúde Pública. Devido ao caráter toxigênico das cepas de clostrídios, as carcaças podem ser contaminadas durante o abate das aves; desta forma, ao serem consumidas podem levar a toxinfecção alimentar (IMMERSEEL et al., 2004). Nesse sentido, os diferentes tipos de *C. perfringens* produzem sinais clínicos distintos, porém não menos importantes. As cepas do tipo A foram associadas a quadros de diarreias autolimitantes em humanos, enquanto que a intoxicação por toxinas do tipo C foram associadas a quadros de enterite necrótica severa capaz, até mesmo, de leva-los a morte (SCHIEHMANN, 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 1961 (PARISH, 1961a,b), que também isolou o *Clostridium welchii*, posteriormente reclassificado como *C. perfringens*. Em outro estudo realizado no mesmo ano, o autor reproduziu a doença experimentalmente (PARISH, 1961c). Poucos anos após estes estudos a doença foi identificada em diversos países (BAMFORD, 1967; BAINS, 1968; BERNIER; PHANEUF; JOHNSON; PINEDO, 1971; LONG, 1973; FILION, 1977; NAIRN; TSAI; TUNG, 1981; CHAKRABORTY et al., 1984; CHAR et al., 1986).

O *C. perfringens* é uma bactéria que tem forma de bastonete; é pleomórfica, e gram-positiva, anaeróbica e formadora de esporos. A patogenia da doença provocada pela bactéria deve-se principalmente à produção de toxinas. Os subtipos de *C. perfringens* podem ser classificados de A a E, com base em seu perfil toxigênico. Atualmente existem 17 frações tóxicas conhecidas que são liberadas pelas cepas de *C. perfringens*; as principais frações, podem ser divididas em toxinas maiores (α , β , ϵ , ι) e toxinas menores. A caracterização do genótipo produtor das toxinas maiores é determinante para alocação nos subtipo (A a E); as toxinas menores compõem grande parte da variedade das toxinas (principais: enterotoxina, δ , θ , κ , λ , μ , ν , neuraminidase) (HATHEWAY, 1990)

O *C. perfringens* tipo A é o que tem sido mais comumente isolado em casos de doenças a campo. Sua principal toxina é denominada de toxina α , uma fosfolipase C considerada como responsável pela maioria das lesões encontradas

nos tecidos. Sua lesão é característica em casos de gangrena gasosa em humanos e em outras espécies. A circulação da mesma pelo organismo provoca alterações cardíacas, resultando em bradicardia e hipotensão culminando estes fatos em choque hipovolêmico (HATHEWAY, 1990).

Quando o *C. perfringens* tipo A é cultivado em meio de cultura ágar sangue, a toxina α é a responsável pela produção do halo de hemólise. A quantificação da toxina têm sido utilizada em casos de intoxicação alimentar buscando-se determinar a fonte de contaminação e, também, rastrear o nível de infecção em um lote de animais (HOOK; JALALUDIN; FITZSIMMONS, 1996).

Estudos recentes têm questionado e mostrado que a toxina α não é a responsável pelas lesões em todos os casos de NE; porém, a imunização de animais com seu toxóide auxilia na prevenção e modifica o desenvolvimento da doença em alguns animais (LOVLAND et al., 2004; KULKARNI et al., 2007; COOPER; TRINH; SONGER, 2009). Por outro lado, uma toxina denominada de NetB foi descrita recentemente como sendo importante agente para o desenvolvimento da patogênese da NE (COOPER et al., 2010; KEYBURN et al., 2008; LEPP et al., 2013). Dentre a grande gama de toxinas, observados na NE citam-se proteases, collagenases, hialuronidases e, entre outras DNases todas relevantes para a caracterização dos sinais clínicos da doença (HATHEWAY, 1990).

A bactéria pode ser isolada diretamente de material fecal cultivado em anaerobiose. Seu crescimento é caracterizado por colônias de aproximadamente 2 mm de diâmetro, brancas, com duplo halo de hemólise. A identificação do *C. perfringens* é feita através do cultivo em meios diferenciais. A determinação da toxinotipagem é realizada pela detecção dos genes codificantes das toxinas através do ensaio da reação em cadeia da polimerase (PCR) (PETIT; GIBERT; POPOFF, 1999; ENGSTROM et al., 2003; BAUMS et al., 2004).

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 nos quais a doença pode se desenvolver em linhagens comerciais de até 112 dias de vida. (BAMFORD, 1967; GARDINER, 1967; BAINS, 1968; HELMBOLDT; BRYANT, 1971; JOHNSON; PINEDO, 1971; BERNIER; PHANEUF; FILION, 1977; NAIRN; 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 dificultam a definição do mecanismo pelo qual ela se inicia. De forma geral, o desenvolvimento da doença está 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, à mudanças de condições ambientais e, por fim, ao estresse (DAHIYA et al., 2006).

Como discutido, os principais fatores que predispõem ao desenvolvimento da NE relacionam-se a algum tipo de desequilíbrio da homeostase intestinal, seja por alterações fisiológicas seja por mudanças na microbiota (DROUAL; FARVER; BICKFORD, 1995; BRISBIN; GONG; SHARIF, 2008; GRENHAM et al., 2011). Salienta-se, no entanto, que dificilmente estes fatores apresentam-se de forma isolada, uma vez que a microbiota comensal está intimamente relacionada ao funcionamento normal do organismo das aves (BARBARA et al., 2008).

Mudanças na alimentação, como por exemplo, na proporção de milho, trigo e cevada ou adição de proteínas de origem animal alteraram o trânsito intestinal e modulam a microbiota predispondo ao desenvolvimento da NE (BRANTON; REECE; HAGLER Jr., 1987; KALDHUSDAL; HOFSHAGEN, 1992; RIDDELL; KONG, 1992; ANNETT et al., 2002; BJERRUM; PEDERSEN; ENGBERG, 2005). Em casos de enterite necrótica, a adição de proteína animal à alimentação aumenta a gravidade das lesões e o oposto ocorre quando se aumenta a proporção de fibras e de carboidratos complexos na dieta (BRANTON; REECE; HAGLER, 1987; BRANTON et al., 1997). A substituição da cevada e do milho por trigo também mostrou-se capaz de reduzir as lesões durante o curso de uma enterite necrótica. Mostrou-se também, que o fornecimento de substratos favoráveis à multiplicação bacteriana aumenta a expressão de genes que traduzem as toxinas (DREW et al., 2004; SHIMIZU, 2004; DAHIYA et al., 2005).

Mais especificamente, 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* sp. (AL-SHEIKHLY; AL-SAIEG, 1980; WILLIAMS et al., 2003). A destruição

parcial do tecido contribui para a adesão bacteriana, fornecendo maior substrato à multiplicação bacteriana pelo extravasamento de proteínas e permitindo uma maior ação das toxinas nos seus sítios de ação (MCCLANE; CHAKRABARTI, 2004; COOPER; SONGER, 2010; COURSDON et al., 2010). Desta forma e por isso, 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 ele pode ter sobre o clostrídio, quanto pela predisposição ao desenvolvimento de processos infecciosos, mesmo que sub-clínicos (ELWINGER et al., 1994; ELWINGER et al., 1998; COOPER; SONGER, 2009).

Os sinais clínicos apresentados durante o desenvolvimento da NE são inespecíficos, embora o desenvolvimento clínico seja rápido e grave (FUKATA et al., 1988). Os principais sinais observados em aves são a diminuição da movimentação, do consumo de ração, apatia, diarreia e o eriçamento das penas (AL-SHEIKHLY; TRUSCOTT, 1977). Com exceção da diarreia, os demais sinais são reflexos inespecíficos do comportamento doentio (JOHNSON, 2002).

O exame necroscópico de aves com NE mostrou distensão por gás das alças intestinais, com aparecimento de lesões características e mais restritas ao intestino delgado, embora tenham sido descritas lesões com menor frequência no ceco, fígado e outros órgãos. A mucosa apresenta-se com coloração enegrecida a arroxeadas; a distribuição e a intensidade das lesões variam com a gravidade da doença. A friabilidade do tecido intestinal e o dano às vilosidades promovem a formação de uma pseudomembrana de coloração verde amarelada denominada de “toalha turca” ou “toalha felpuda” (LONG; PETTIT; BARNUM, 1974; GOLDER et al., 2011). Em casos mais graves ocorre a 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 focais, com formação de regiões acinzentadas a enegrecidas 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 a coalescente da mucosa; próximo à região de necrose ocorre a formação de 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 o fusionamento e a atrofia das vilosidades com diminuição das células de Globet e perda acentuada dos microvilos (NAIRN; BAMFORD, 1967; HELMBOLDT; BRYANT, 1971; LONG; PETTIT; BARNUM, 1974).

2.3 Sistema Imune e Intestino

O intestino delgado possui diversas projeções denominadas de vilos. Cada vilo é uma projeção da lâmina própria coberta por uma camada de células absorptivas com microprojeções. Nas aves, os vilos são maiores no duodeno, sendo de tamanho reduzido e apresentando menor espaço entre si no jejuno e no íleo. Os vilos são estruturas sensíveis e podem variar de conformação em função da idade, microbiota intestinal e estado imune (YAMAUCHI; KAMISOYAMA; ISSHIKI, 1996; STALKER; HAYES; MAXIE, 2007).

Na base dos vilos são encontradas estruturas tubulares que se abrem à luz intestinal e que são denominadas de criptas de Lieberkühn. Nesta região são encontradas as células progenitoras do epitélio constituinte da mucosa. A medida que o tecido sofre descamação ou outros tipos de lesões, estas células entram em mitose regenerando o epitélio. As células tronco permanecem nas criptas e podem se diferenciar para enterócitos que são predominantes nas criptas e que afetam a capacidade de secreção de eletrólitos e de divisão mitótica (STALKER; HAYES; MAXIE, 2007).

As células oligomucosas são células imaturas derivadas da mitose das células tronco. Produzem um tipo de mucina e seguem a maturação até a formação das células de Globet, que se distribuem até o topo do vilos. A principal característica destas células é a produção e secreção por exocitose de mucina para a luz intestinal. Além da capacidade de produção de muco, estas células produzem e liberam um importante fator necessário para a regeneração dos vilos após um estímulo lesivo. O muco, além da função de proteção física, carrega substâncias importantes para a imunidade local como: lisozimas e defensinas, produzidas pelas células de Paneth e células imunes. Dímeros de imunoglobulinas são liberados para a luz intestinal pelos enterócitos, formando uma das principais defesas inatas e adaptativas do SI de mucosa. A hiperplasia das células de Globet pode ser desencadeada por diversos agentes, sendo o processo inflamatório um importante estímulo para esta divisão (HART; KAMM, 2002; STALKER; HAYES; MAXIE, 2007).

As células de Paneth são menos frequentes em aves em comparação com mamíferos; em algumas espécies de aves não são sequer visualizadas. Deste modo ao se considerar, o mecanismo de defesa das aves, acredita-se que a participação destas células, foi compensada pela ativação de outras vias. Enquanto em mamíferos encontra-se uma ampla gama de defensinas no intestino, nas aves a produção permanece restrita às β -defensinas (ZHAO et al., 2001; HIGGS et al., 2005). Sendo assim, as defensinas nas aves são liberadas principalmente por macrófagos e heterófilos, e não pelas células epiteliais como nos mamíferos (EVANS et al., 1994, 1995; ZHAO et al., 2001).

As células tronco intestinais podem se dividir em outro tipo celular denominado de enteroendócrinas. Estas células secretam serotonina, somatostatina e, também, proteínas. A distribuição destas células em aves é semelhante àquela descrita em mamíferos (OHMORI; OKADA; WATANABE, 1997; SALVI; RENDA, 1986; D'ESTE; BIANCONE; RENDA, 1986; GULMEZ et al., 2003). A importância das células enteroendócrinas se faz presente na regulação neuroimunoendócrina intestinal.

As células epiteliais permanecem em comunicação direta com a lâmina basal; os enterócitos são as principais células encontradas nos vilos, sendo responsáveis pela absorção de nutrientes, água e eletrólitos, o que garante a homeostase intestinal. Possuem relevante papel nas infecções por serem o primeiro tipo celular a

entrar em contato com os microrganismos intestinais (ASSIMAKOPOULOS; PAPAGEORGIOU; CHARONIS, 2011). Os enterócitos se mantêm unidos com o auxílio de proteínas (occludinas e claudinas) que formam as junções ocludentes (*tight junctions*) (FELDMAN; MULLIN; RYAN, 2005; ASSIMAKOPOULOS; PAPAGEORGIOU; CHARONIS, 2011). A alteração destas proteínas leva a desordens absortivas, como a diarreia. Algumas toxinas produzidas pelo *C. perfringens* agem especificamente nas proteínas (occludinas e integrinas) constituintes das junções ocludentes (ASSIMAKOPOULOS; PAPAGEORGIOU; CHARONIS, 2011).

Além das funções supracitadas, os enterócitos possuem receptores de reconhecimento de padrões (PRR), que são importantes para o início de uma resposta imune; sua desregulação leva a doenças autoimunes. Estas células reconhecem os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) e sua função está ligada ao reconhecimento de antígenos de microrganismos patogênicos e de outros da microbiota comensal (HU et al., 1993; NERREN; KOGUT, 2009; KAWAI; AKIRA, 2010;). Um exemplo destes receptores que reconhecem tais moléculas são aquelas que se assemelham ao Toll (*Toll-like receptors*: TLR) (TRINCHIERI; SHER, 2007; NERREN et al., 2010; KOGUT et al., 2012;). Um característica peculiar dos enterócitos das aves é a capacidade de expressar em sua superfície o complexo de histocompatibilidade (MHC) do tipo I e MHC tipo II. Isso faz com que os enterócitos tenham a capacidade de apresentar antígenos para linfócitos T CD8+ e CD4+ (DAVISON et al., 2008).

Entre a camada de enterócitos existem os linfócitos intepiteliais (IEL), e sua interação com os linfócitos se dá de forma diferente à do MHC. A maioria dos IEL é constituída por células *natural killers* (NK) e linfócitos expressando receptores $\gamma\delta$ e $\alpha\beta$ (TCR- $\gamma\delta$ e TCR- $\alpha\beta$) (SMITH; BEAL, 2008). A função deste tipo celular ainda permanece incerta, porém estudos têm mostrado que os IEL TCR- $\gamma\delta$ possuem participação importante na integridade intestinal de mamíferos e são capazes de prevenir infecções por patógenos intracelulares como, por exemplo, por *Salmonella* (DALTON et al., 2006).

O arcabouço para as células imunes no intestino é feito pela lâmina própria; um estroma de origem mesenquimal. Sua constituição de tecido fibroso e a presença de vasos sanguíneos permite a correta nutrição das células inflamatórias servindo de

sustentação para a montagem de uma resposta imune. Desta forma, pode-se dizer que a lâmina basal interage com os enterócitos e que têm importante papel na organogênese intestinal (LAHAR et al., 2011).

As aves não possuem um tecido linfóide secundário estruturado como os linfonodos; em contrapartida, apresentam diversos agregados linfóides na mucosa intestinal. As células M, que revestem as regiões dos tecidos linfóides associados à mucosa (GALT) sobre as placas de Payer permanecem esparsas sobre o epitélio, e captam e direcionam os antígenos para as células dendríticas e para os macrófagos presentes na lâmina própria que, por sua vez, o apresentam aos linfócitos. A lâmina própria contém diversos tipos celulares, dentre eles os linfócitos T e B, macrófagos, heterófilos e células dendríticas. As áreas de agregados de linfócitos T e B são distintas no tecido; a maioria dos linfócitos B permanece em centros germinativos da lâmina própria (JEURISSEN; VERVELDE; JANSE, 1994; JEURISSEN; WAGENAAR; JANSE, 1999).

As placas de Payer possuem vilos pequenos ou ausentes, e presença de centros germinativos reativos na lâmina própria. Nos espaços entre os centros germinativos observa-se uma ampla distribuição de linfócitos T auxiliares que expressam principalmente TCR $\alpha\beta$. Os plasmócitos expressam em sua superfície, sobretudo IgY, o que é característico de uma resposta adaptativa. Muitos dos plasmócitos IgA⁺ presentes na placa de Payer e que estão distribuídos na lâmina própria intestinal migraram da bursa de Fabricius. Deste modo, infere-se que a bursectomia comprometa a imunidade intestinal (BEFUS et al., 1980; BURNS, 1982).

A imunidade humoral participa de forma ativa da imunidade intestinal, sendo a IgA a principal imunoglobulina liberada na luz intestinal. Os plasmócitos presentes na lâmina própria são responsáveis por secretar monômeros de IgA contra os antígenos apresentados aos linfócitos B. Os monômeros liberados próximos ao epitélio são carregados pelos enterócitos e estão acoplados a uma glicoproteína carreadora presente na região basolateral da célula epitelial. O carregamento e o acoplamento dos monômeros de IgA à proteína carreadora (J) gera dímeros de IgA que são transportados em vesículas e liberados na luz intestinal. A função destas moléculas é evitar a adesão de microrganismos à superfície do epitélio levando à neutralização de toxinas (FAGARASAN, 2006).

As imunoglobulinas e as linhagens de células fagocíticas constituem a primeira linha de defesa orgânica contra microrganismos presentes na luz do trato gastrointestinal das aves. Os macrófagos e os heterófilos representam as principais células envolvidas nesta defesa. Os heterófilos das aves são correspondentes aos neutrófilos dos mamíferos; porém, apresentam características morfológicas e funcionais peculiares (ANDREASEN et al., 1991; TERRÓN et al., 2004). Embora existam trabalhos que descrevam uma baixa atividade de mieloperoxidase e atividade oxidativa em heterófilos, existem outros que demonstram uma participação ativa de radicais livres na resposta que apresentam contra patógenos (SPITZNAGEL, 1975; TROWELL; BREWER, 1976; MONTALI, 1988; KOGUT et al., 1995; PENNIAL; TERRÓN et al., 2004;).

O reconhecimento dos antígenos pelos TLR é responsável pela ativação da transcrição de diversas citocinas próinflamatórias e pela degranulação das células fagocíticas (TRINCHIERI; SHER, 2007). A resposta imune que ocorre, varia em função do tipo de receptor reconhecido. Os TLR são moléculas que participam tanto da resposta imune inata como adaptativa aos patógenos; existem dez tipos de TLR conhecidos, considerando-se aqueles ortólogos aos de mamíferos (BOYD et al., 2001; FARNELL et al., 2003; AKIRA; TAKEDA, 2004; KAWAI; AKIRA, 2010).

2.4 Estresse por Calor

O estresse por calor pode ser entendido como o aumento da temperatura ambiente acima do nível de conforto térmico do animal; a temperatura elevada é considerada um estressor (QUINTEIRO-FILHO et al., 2010, 2012).

A União Europeia, através da Diretiva 2007/43/EC de 28 de Junho, limitou a densidade de aves por área em um sistema de criação, podendo-se em casos circunstanciados aumentar-se esta densidade. No entanto, embora exista maior preocupação do ponto de vista do bem-estar animal quanto à densidade de criação, os piores fatores estressantes do ponto de vista do setor produtivo dizem respeito à manutenção dos animais como, por exemplo, temperatura, umidade, higiene ambiental e qualidade do ar (DAWKINS; DONNELLY; JONES, 2004). Mesmo

considerando-se o relatório do Comitê da Saúde e de bem-estar animal europeu sobre o bem estar na criação de frangos de corte – que aborda praticamente todos fatores ambientais envolvidos na criação – pode-se dizer que nenhuma legislação considera diretamente, isto é, de forma específica a questão do estresse por calor.

O estresse por calor aumenta a liberação de corticosteroides pelas fezes dos animais e relaciona-se diretamente com o índice de mortalidade (TROUT; MASHALY, 1994). A queda que ele produz em parâmetros produtivos, como conversão alimentar, ganho de peso, número e qualidade dos ovos, qualidade de carcaça, são um reflexo direto 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., 2012). Segundo alguns autores, nos atuais sistemas de criação de frangos de corte as condições ambientais são mais importantes para o ganho produtivo que a densidade dos animais (DAWKINS; DONNELLY; JONES, 2004).

As aves possuem uma temperatura corpórea que varia de 40,6° C a 43,0° C. Para a manutenção desta temperatura corporal é necessário que ela perca a mesma quantidade de calor que ela ganha (SWENSON; REECE, 2006). Os frangos de corte foram selecionados para maior eficiência produtiva dentro de um curto período de tempo. Para que se atinjam estes objetivos, esses animais precisam ingerir grande quantidade de alimento o que produz uma alta quantidade de energia térmica via metabolismo. Um animal com 2 kg de peso corporal gera em torno de 10 a 15 watts de energia térmica; somando-se a produção calórica de todos os animais de um galpão chegaríamos a produção de energia em uma proporção de kilowatts. Para exemplificar, os aquecedores domésticos possuem uma média de 1500 watt de potência (MITCHELL; KETTLEWELL, 1998).

A umidade relativa do ar é um importante fator na variação térmica, uma vez que quando muito alta diminui a perda evaporativa de calor. Por outro lado, quando baixa umidade relativa do ar associa-se a altas temperaturas ambientes, os animais desidratam-se de forma muito rápida. A associação da umidade relativa com a temperatura ambiente altera a sensação térmica dos animais. As aves mais jovens e as fêmeas apresentam maior desconforto às condições estressantes impostas pelas variações da temperatura aparente (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 e perda de calor por condução nas barbelas, crista, coxins plantares e pelo contato do peito com a cama. A hiperventilação compensatória desencadeia alterações bioquímicas, que podem se refletir em outros sistemas. Desta forma, o aumento de CO₂ circulante e a alcalose sanguínea são efeitos secundários induzidos pela hiperventilação (GLEESON; BRACKENBURY, 1984).

A manutenção da homeotermia é regulada através de mecanismo de integração central no hipotálamo a partir de 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. Sabe-se serem os receptores centrais 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 (SWENSON; REECE, 2006). Quando a resposta comportamental não supre a elevação da temperatura, os mecanismos fisiológicos são ativados para compensar o desbalanço térmico. A resposta a um estímulo térmico é proporcional à quantidade de receptores acionados à área estimulada e à localização destes receptores. Mostrou-se que a ativação de receptores centrais sobrepujam os estímulos periféricos, pois, ativam todos os mecanismos compensatórios independentemente da estimulação de receptores periféricos (SWENSON; REECE, 2006).

Embora o hipotálamo trabalhe para a manutenção de uma temperatura corpórea constante, existe uma variação da temperatura corporal normal durante o ciclo de um dia. Próximo ao despertar as aves apresentam temperatura mais baixa, sendo ela mais alta no fim do dia; isto se torna importante dentro de um galpão em que uma oscilação em 1º C em várias aves pode produzir uma variação térmica ambiental significativa (SWENSON; REECE, 2006).

Em casos em que a perda de calor por processo não evaporativo seja zero, os mecanismos evaporativos devem ser suficientes para compensar o ganho de calor metabólico. Quando a temperatura ambiente é superior à temperatura corporal, a perda não evaporativa torna-se negativa, aumentando consideravelmente, aquela por via evaporativa. Estima-se que a cada 1º C de aumento da temperatura

ambiente, acima da temperatura corporal, há um aumento aproximado de 10% na taxa metabólica de uma ave, efeito este denominado de *van't Hoff* (SWENSON; REECE, 2006). O aumento excessivo da temperatura ambiental e/ou a ineficiência dos mecanismos compensatórios termorreguladores provoca a hipertermia do animal, ou até mesmo choque por calor, gerado principalmente pelo aumento da temperatura no SNC (SWENSON; REECE, 2006).

A fase inicial da hipertermia, em que a desidratação associada à hipovolemia desencadeia a vasodilatação periférica, pode levar à hipotensão arterial e até mesmo à morte do animal de forma aguda (SWENSON; REECE, 2006). A elevação da temperatura ambiental sem que se ultrapasse a temperatura corpórea, produz o estresse, cujos sinais se exacerbam caso o estímulo seja mantido cronicamente, tornando-se mensuráveis pelo aumento dos níveis circulantes de corticosterona e pelas alterações de comportamento das aves. Entretanto, a hipertermia não se desenvolve nos animais quando existe perda calórica compensatória (SWENSON; REECE, 2006).

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 da 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 HHA. O CRH, peptídios relacionados ao CRH e os receptores de CRH foram colocados no rol dos mecanismos capazes de modular o metabolismo energético. Essas vias a que influenciam diretamente o equilíbrio térmico têm papel fundamental, e são desreguladas durante um estresse (HILLHOUSE; RICHARD; LIN; TIMOFEEVA, 2002; BALE et al., 2003; GRAMMATOPOULOS, 2006; CHEN et al., 2012;).

Finalmente, relatou-se ser a hipertermia responsável pela produção de lesão oxidativa celular, o 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).

Pelo exposto infere-se que o estresse por calor possuía características negativas sobre o ganho produtivo, o sistema imune intestinal e a morfologia intestinal (DENG et al., 2008; QUINTEIRO-FILHO et al., 2010a,b, 2012); porém, poucos estudos analisaram em profundidade a interrelação entre esses achados e, em especial, sobre efeitos do estresse por calor sobre a integridade dos sistemas biológicos e sobre a resistência orgânica a processos infecciosos das aves. Este é o objetivo do presente trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Avaliar, dentro de uma perspectiva neuroimunológica, os efeitos do estresse por calor sobre o desenvolvimento da enterite necrótica aviária em aves infectadas por *Clostridium perfringens* tipo A.

2.2 Objetivos específicos

1. Desenvolver protocolo de infecção experimental em frangos de corte por *C. perfringens*;
2. Desenvolver protocolo para cultivo de *C. perfringens*;
3. Avaliar distribuição de linfócitos B e plasmócitos intestinais por imunohistoquímica nas aves dos grupos I, I/HS35, T, T/HS35;

Avaliar nas aves de todos os grupos:

4. Ganho de peso total e peso relativo de baço e Bursa de Fabricius;
5. A produção de IgA, IgM e IgY séricas;
6. Os achados macroscópicos no intestino delgado;
7. Os achados histopatológicos do intestino delgado;
8. Os níveis séricos de Corticosterona;
9. A produção de IgA intestinal (duodeno e jejuno).

Posteriormente, com os dados obtidos nos experimentos, será feita uma interpretação dentro de uma perspectiva neuroimunológica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia, e Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

4.1 Animais

Foram utilizados 60 frangos de corte, Linhagem Cobb®, machos, livres de patógenos específicos (SPF), adquiridos de incubatório comercial com 1 dia de vida. Os animais foram mantidos nas dependências do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, conforme normas do Comitê de Bioética, com protocolo número 2570/2012. As aves foram alojadas em isoladores (Alesco, SP, Brasil) específicos para a experimentação dos animais em estudo, respeitando-se um limite máximo de 12 aves/m². As aves receberam luz artificial com ciclo de 12h, com fornecimento de água *ad libitum* e manejo alimentar segundo especificações do item 4.3. Os animais foram observados constantemente, verificando o estado de saúde e comportamento.

4.2 Determinação dos grupos

Os animais foram divididos em dois grandes grupos, estressados por calor (HS35) e não estressados por calor, sendo cada grupo composto por 3 subgrupos:

1 – Grupo Controle (C): Criados em condições normais de alimentação.

2 – Grupo Tioglicolato (T): Animais com manejo alimentar igual ao grupo infectado sem adição das bactérias. Grupo controle para determinação das alterações produzidas pelo caldo tioglicolato (meio de cultura empregado ao cultivo do *C. perfringens*).

3 – Grupo Infectado (I): Animais submetidos a infecção por *C. perfringens*.

A nomenclatura empregada corresponde ao tratamento do grupo (C, T ou I) seguido de **/HS35** para determinação de grupo que sofreu estresse por calor. A ausência da nomenclatura **/HS35**, indica que o animal foi criado dentro das temperaturas de conforto térmico.

Foram utilizados 60 animais, sendo cada grupo composto por 10 animais.

4.3 Manejo alimentar

4.3.1 Manejo alimentar dos grupos C e C/HS35

Nos 7 primeiros dias os animais foram alimentados com ração comercial para aves destinadas a produção de carne contendo 24% de proteína bruta (PB). Do 8º ao 21º dia de vida os animais foram alimentados com ração contendo alta concentração proteica (28% PB). Os animais foram submetidos a eutanásia em câmara de CO₂ no 21º dia de vida (Figura 1).

Figura 1 - Esquema do manejo alimentar dos grupos C e C/HS35

4.3.2 Manejo alimentar dos grupos T, T/HS35, I e I/HS35

Nos 7 primeiros dias de vida os animais foram alimentados com ração comercial para aves destinadas à produção de carne 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 com farinha de peixe (55% PB) na proporção de 1:1 (v/v). No 15º dia de vida iniciou-se o fornecimento de meio de cultura com cepa patogênica de *C. perfringens* (grupos I e I/HS35) ou meio de cultura caldo tioglicolato (T/THS35) na proporção de 1:1 (v/v) misturados na ração comercial para engorda com 28% de PB. O período de infecção perdurou até o 21º dia de vida, quando foi realizada a eutanásia dos animais (Figura 2).

Figura 2 - Esquema do manejo alimentar dos grupos T, T/HS35, I e I/HS35

4.4 Preparo do inóculo e protocolo de infecção

Foi utilizada cepa patogênica de *C. perfringens* tipo A previamente isolada de caso clínico de granja aviária de frangos de corte, cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, professor titular da FMVZ-USP e responsável pelo Laboratório de Ornitopatologia. A amostra estava mantida em glicerol a -80° C.

Para a preparação do inóculo, a bactéria estocada foi cultivada em placas contendo ágar infusão de cérebro e coração (BHI; Difco), acrescido de 5% de sangue citratado bovino e 1% de extrato de levedura. Após incubação em condições anaeróbicas a 37°C por 24 horas, duas colônias foram transferidas para um tubo contendo 10mL de meio de carne cozida (MCC; Difco), que foi incubado a 37° C por 18 horas. Após incubação o resultado da cultura foi transferido para frasco contendo 100 mL de meio fluido tioglicolato (MFT; Difco) e incubado nas mesmas condições anteriores. O resultado após incubação foi diluído na proporção 1:10 em 300 mL de MCC e incubado nas mesmas condições anteriores. Decorrido o tempo de incubação, 33 mL da cultura foram transferidos para frasco contendo 1 L de MFT acrescido de 3% de extrato de levedura. Após incubação a 37° por 18 h, o meio foi utilizado para a infecção dos animais. O número de bactérias foi de

aproximadamente 10^8 bactérias por mL de meio de cultura, verificado através de contagem em câmara de Neubauer.

Os animais receberam o meio de cultura contendo as bactérias do 15º ao 21º dia de vida através do fornecimento de uma mistura na relação 1:1 (v/v) de ração de alto teor proteico (28% PB) e MFT com *C. perfringes* cultivados nas condições citadas anteriormente. A ração foi fornecida em comedouros de alumínio e o inócuo foi descartado a cada alimentação subsequente realizada diariamente. Os animais possuíam exclusivamente a mistura destinada a infecção.

4.5 Estresse por calor

As aves foram alojadas durante os 13 primeiros dias de vida nas temperaturas recomendadas para a espécie ($35^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ do 1º ao 7º dia de vida, $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ do 7º ao 14º dia de vida). O estresse térmico por calor foi aplicado nos grupos experimentais com a utilização da elevação da temperatura ambiente ($35^\circ \pm 1^\circ\text{C}$) por aquecedores do 14º ao 21º dia de vida. A umidade relativa do ar foi monitorada para não se tornar inferior a 45%. Ao final do experimento (21º dia de vida), os animais foram eutanasiados (Figura 3).

Figura 3 - Esquema do estresse por calor dos grupos C/HS35, T/HS35 e I/HS35

4.6 Coleta de sangue

A coleta do sangue foi realizada após o período experimental, pela veia braquial, na parte interior da asa. O sangue foi armazenado em tubos de poliestireno de 1,5mL para microcentrífuga e mantidos a temperatura ambiente para retração do coágulo. Após isso, as amostras foram centrifugadas (3220g por 15 minutos a 4°C) para obtenção do soro, o qual foi armazenado em freezer a -20°C, até o período de realização de quantificação de imunoglobulinas e corticosterona.

4.7 Avaliação macroscópica intestinal

A necropsia dos animais foi realizada logo após a eutanásia, que ocorreu no 21º dia. Ao proceder com a abertura das cavidades, o posicionamento e características macroscópicas dos órgãos foram avaliados para proceder com a retirada das porções do intestino delgado, baço e Bursa de Fabricius. As porções do intestino delgado foram separadas (duodeno, jejuno e íleo) e seccionadas para

avaliação macroscópica da mucosa. A apresentação macroscópica da mucosa intestinal observada foi classificada e atribuída nota de escore segundo o descrito no quadro 1.

Quadro 1 - Critérios para determinação do escore macroscópico do intestino delgado dos animais

Escore	Descrição dos critérios
0	Sem alteração
+1	Parede intestinal flácida que já não tende a voltar a posição anterior após excisionada. Presença de muco com bolhas e gás de odor fétido. Mucosa avermelhada e conteúdo mucoso sanguinolento na luz intestinal.
+2	Parede intestinal flácida e espessada com tecido friável. Descolamento da serosa quando manipulada e coloração vermelho purpúrea. Mucosa avermelhada com presença de placas esbranquiçadas ou enegrecidas multifocais. Aumento de muco com presença de bolhas e gás de odor fétido. Distensão gasosa.
+3	Parede intestinal flácida e friável, com fácil ruptura à manipulação. Serosa com coloração vermelho-purpúrea, de fácil descolamento ao toque. Mucosa avermelhada com presença de placas esbranquiçadas e enegrecidas multifocais. Distensão gasosa.
+4	Parede intestinal flácida com fácil ruptura à manipulação. Pontos de descolamento da serosa e coloração vermelho purpúrea tendendo a coloração enegrecida. Placas esbranquiçadas e enegrecidas difusamente distribuídas. Presença de muco e de material fibrilar esbranquiçado. Mortalidade elevada.

4.8 Cultura bacteriológica

Porções do conteúdo intestinal foram diluídas em tampão fosfato (PBS; pH 7.2, 0,01 M) e semeadas 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 foram avaliadas as características das colônias e o tipo de hemólise no meio de cultura.

4.9 Quantificação de IgA intestinal

Foram dissecadas e separadas secções com 4 cm das porções distais do duodeno e jejuno. O fluido intestinal foi coletado empregando-se 5mL de tampão fosfato (PBS; pH 7.2, 0,01 M) com inibidores de protease pepistatina (0,7 µg/mL) e leupeptina (0,5 µg/mL) a 4°C. O conteúdo do lavado recuperado foi centrifugado a 10000 g, por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C até a realização dos testes. Os níveis de IgA foram determinados empregando-se kit de ELISA comercial (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA).

4.10 Quantificação dos níveis séricos de corticosterona

O sangue foi coletado conforme especificado no item 4.6. A dosagem de corticosterona foi realizada por kit de ELISA comercial (Arbor Assays, Michigan, USA), precedida de padronização da diluição do soro. A concentração sérica de corticosterona foi determinada com o auxílio de uma curva padrão expressa em picogramas de corticosterona por mililitro de soro (µg/mL), e os resultados foram multiplicados pelo fator de diluição empregado no teste.

4.11 Quantificação dos níveis séricos de imunoglobulinas

O sangue foi coletado conforme especificado no item 4.6. As dosagens de IgA, IgM e IgY foram realizadas por ELISA, a partir de kits comerciais (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA). A concentração sérica de imunoglobulinas foi determinada com o auxílio de uma curva padrão expressa em nanogramas de imunoglobulina por mililitro de soro (ng/mL), e os resultados foram multiplicados pelo fator de diluição empregado no teste.

4.12 Exame anatomopatológico intestinal

Secções do duodeno, jejuno e íleo das aves foram colocadas em frasco contendo formol 4% por 48 horas; posteriormente, o material seguiu procedimento padrão para inclusão do tecido foi feito no Laboratório de Histologia do VPT-FMVZ. Cortes transversais de 5 µm dos segmentos dos intestinos foram corados por hematoxilina e eosina (HE). Parte do material foi destinado a colorações com ácido periódico-Schiff (PAS) e Gram, sendo utilizadas para visualização da presença de muco e para evidenciar as células caliciformes (PAS), bem como para identificar a característica tintorial das bactérias encontradas aderidas a mucosa intestinal (Gram). Para observação do muco ácido produzido nas porções do intestino delgado, secções foram submetidas à coloração de Alcian blue. O exame histopatológico foi realizado em microscopia óptica, sob os aumentos de 40x, 200x e 400x.

Foram avaliadas todas as estruturas do intestino, como mucosa, submucosa, muscular e serosa e foram considerados normais os dados provenientes dos animais do grupo controle (C). Para determinação das lesões e comparação entre os grupos, foi empregada uma análise semiquantitativa por sistema de escore descrito na quadro 2. Cada porção intestinal recebeu uma nota de 0 a 4 correspondendo aos critérios descritos na quadro 2; os dados foram tabulados e utilizados para as análises estatísticas. A análise de todos os segmentos considerou a distribuição, tipo

e quantidade de células imunes e células que compõem o tecido em questão, guardando-se as diferenças relativas a cada porção intestinal.

Quadro 2 - Critérios para determinação do escore microscópico do intestino dos animais

Escore	Descrição dos critérios
0	Vílos íntegros, ausência de infiltrado inflamatório e agregados linfoides não reacionais. Distribuição normal de células caliciformes e epitélio íntegro.
+1	Migração discreta de heterófilos (+) com predomínio em lâmina própria; fusonamento discreto de vilosidades, com ou sem congestão discreta.
+2	Migração moderada de heterófilos (++) com predomínio em lâmina própria, presença de congestão moderada, fusonamento de vilosidades discreto a moderado, aumento da dimensão das células caliciformes e destacamento de topo de vilosidades; áreas focais de necrose em vilos.
+3	Migração de heterofilo difusa (+++) em lâmina própria e vilos, com infiltrado linfoplasmocitário; fusonamento de vilosidades multifocal a difuso, atrofia de vilosidades; congestão grave; áreas de necrose em submucosa e mucosa.
+4	Presença de infiltrado polimorfonuclear e linfoplasmocitário difuso; áreas de necrose grave em mucosa e submucosa; fusonamento de vilosidades e atrofia de vilosidades; predomínio de células caliciformes no epitélio.

4.13 Exame anatomopatológico de baço e bursa de Fabricius

O baço e a bursa foram coletados quando da necropsia e posteriormente embebidos em frasco contendo formol 4% por 48 horas. O material seguiu procedimento padrão para inclusão do tecido no Laboratório de Histologia do VPT-FMVZ. Cortes transversais de 5 µm dos segmentos dos órgãos foram corados por hematoxilina e eosina (HE) e o exame histopatológico foi realizado em microscopia óptica, sob os aumentos de 40x, 200x e 400x.

4.14 Análise imunoistoquímica de linfócitos B no intestino delgado

Fragmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno, íleo) dos frangos de corte foram submetidos a exame imunoistoquímico. Foram utilizados anticorpos monoclonais anti-Bu (Clone AV20, SouthernBiotech, Birmingham, USA) na diluição de 1:50 para identificação fenotípica de linfócitos B. O método utilizado na técnica foi de estreptavidina-biotina-peroxidase, adaptadas às nossas condições laboratoriais (SÁ, 2004), tendo como substrato o diaminobenzidina (DAB) para revelação da reação. As lâminas foram observadas em microscopia óptica nos aumentos de 40x, 200x e 400x, para avaliação qualitativa do infiltrado linfocítico.

4.16 Análise estatística

Os dados paramétricos foram submetidos a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, para avaliação dos contrastes. Os resultados não paramétricos foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis, e teste *post hoc* de Dunn para correção das comparações entre os grupos (PEREIRA, 2010). Foram considerados significantes as análises com $P \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Protocolo de cultivo de *C. perfringens*

A padronização do cultivo foi realizada com êxito empregando-se meios de cultivo divulgados na literatura (COOPER, 2010). O processo foi descrito no item 4.4. Foi possível obter ao final do cultivo a quantidade de células viáveis com potencial patogênico satisfatório ao modelo experimental desenvolvido.

5.2 Protocolo de infecção experimental em frangos de corte por *C. perfringens*

Seguindo-se levantamento bibliográfico quanto aos modelos de enterite necrótica aviária em frangos de corte, foi possível delinear o protocolo de infecção experimental descrito nos itens 4.3 e 4.4. Obteve-se um índice de infecção com o desenvolvimento da doença em 100% dos animais que receberam o inóculo na ração, independente do protocolo de estresse. A confirmação da infecção foi realizada por exame macroscópico e microscópico dos intestinos dos animais.

5.3 Avaliação do peso dos animais e peso relativo de baço e bursa de Fabricius das aves

Findo o período de infecção experimental (21º dia de vida), os animais foram submetidos à eutanásia. O primeiro procedimento foi a retirada do baço e da bursa de Fabricius para pesagem. Os resultados foram representados na figura 4.

Conforme observado na figura 4, o estresse por calor produziu menor ganho de peso corporal em todos os grupos em relação ao medido nos grupos não estressados, fato evidenciado pelo menor valor da mediana e valores interquartis

inferiores nos grupos C/HS35 e I/HS35. As alterações de pesos corporais foram pouco evidentes quando observados os valores médios e seus respectivos desvios padrões (Tabela 1). Foi observada uma diferença estatisticamente significativa quando comparados os pesos corporais das aves do grupo C em relação às do grupo I/HS35 ($P < 0,05$). Apesar da acentuada diminuição de peso corporal das aves do grupo C/HS35 em relação às do grupo C, representado pelo deslocamento da mediana e valor interquartil, o mesmo não foi observado dentro dos grupos que receberam tioglicolato ou foram infectados.

O grupo de aves que recebeu tioglicolato sem infecção apresentou peso corpóreo intragrupo mais homogêneo em relação ao dos demais grupos; o resultado pode ser visualizado por menores valores interquartís (Figura 4) e pelo menor desvio padrão (Tabela 1). Os grupos C/HS35, I e I/HS35 apresentaram animais com peso mínimo inferiores a 500 g. O grupo C foi o único a apresentar animal com peso corpóreo máximo superior a 700 g. Os resultados relativos aos pesos corpóreos foram estatisticamente significantes ($P < 0,05$).

Figura 4 - Efeito dos tratamentos e estresse por calor sobre o peso corporal dos animais

Legenda: Os resultados representam boxplots com valores máximos e mínimos dos pesos dos frangos de corte. Teste post hoc de Tukey para determinação de outliers ($n=10/\text{grupo}$); • Animal outlier segundo teste de Tukey; * $P < 0,05$ do grupo I/HS35 em relação ao grupo C; Teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn para correção das comparações entre grupos ($P < 0,05$).

Tabela 1 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre a média do peso corporal dos animais

Parâmetro	C	C/HS35	T	T/HS35	I	I/HS35
Peso (g)	630,40±71,75*	544,70±77,70	583,40±50,09	568,70±55,94	526,90±66,00	525,80±62,29*

Notas: Os dados representam a média ± desvios padrão. *P<0,05 do grupo I/HS35 em relação ao grupo C; Teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn para correção das comparações entre grupos (P<0.05).

Com os valores dos pesos corporais, do peso do baço e da bursa de Fabricius, foram calculados os valores de pesos relativos dos órgãos. Os cálculos foram realizados pela relação entre o peso do órgão e o peso total do animal; os valores foram calculados individualmente sendo, posteriormente, agrupados para a comparação entre os grupos.

Conforme observado na figura 5, houve pouca diferença entre os pesos relativos do baço entre os grupos, demonstrado por pequeno deslocamento entre as medianas e valores interquartis próximos; porém, às aves dos grupos C/HS35 e I apresentaram menores pesos médios do baço em relação ao dos demais grupos.

O estresse por calor diminuiu o peso relativo do baço em relação ao seu respectivo grupo não estressado (grupo C em relação ao grupo C/HS35 e grupo I em relação ao grupo I/HS35), evidente pela diminuição das medianas. O mesmo não foi observado no grupo que recebeu tioglicolato sem infecção. Tais resultados não podem ser visualizados através das médias devido ao fato de os pesos máximos apresentados pelos animais dos grupos infectados mascararem os pesos mais baixos (Tabela 2). Os pesos relativos dos baços do grupo T/HS35 foram discretamente superiores em relação aos do grupo T, resultado evidente pelos valores das medianas; porém, os intervalos interquartis apresentaram pouca diferença.

Figura 5 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre o peso relativo do baço dos animais

Legenda: Os resultados representam boxplots com valores máximos e mínimos dos pesos relativos do baço (n=10/grupo); Teste de Kruskal-Wallis e teste post hoc de Dunn para correção das comparações entre grupos (P=0,7661).

Tabela 2 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre a média do peso relativo do baço dos animais

Parâmetro	C	C/HS35	T	T/HS35	I	I/HS35
Peso Relativo (g/g) x 10⁻⁴	9,26 ± 2,75	7,80 ± 2,10	8,23 ± 1,71	8,47 ± 1,59	7,75 ± 3,47	8,73 ± 4,55

Notas: Os dados representam a média ± desvios padrão. *P<0,05 do grupo I/HS35 em relação ao grupo C; Teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn para correção das comparações entre grupos (P<0.05).

O estresse por calor reduziu os pesos relativos da bursa de Fabricius das aves do grupo C/HS35 em relação às aves do grupo C (P<0,01), daquelas do grupo I/HS35 em relação às do grupo I e das aves do grupo T/HS35 em relação às do grupo T (Figura 6). O estresse por calor levou à obtenção de médias mais baixas dos pesos relativos das bursas de todos os grupos estressados em relação às aves dos grupos não estressados (Tabela 3). Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os valores do grupo C/HS35 em relação aos dos grupos C (P<0.01), T (P<0,0001) e T/HS35 (P<0,05); as diferenças se devem aos menores pesos relativos das bursas das aves do grupo C/HS35 em relação às dos demais grupos. Foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa dos pesos relativos das bursas do grupo T em relação às do grupo I/HS35 (P<0,05). O grupo C/HS35 apresentou peso de bursa mínimo em relação ao das aves dos demais grupos, e o grupo T apresentou animal com valor máximo dos pesos relativos da

bursa em relação aos demais grupos (Figura 6). Os resultados dos pesos relativos das bursas foram estatisticamente significantes ($P < 0,001$).

Figura 6 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre o peso relativo da Bursa de Fabricius dos animais

Legenda: Os resultados representam boxplots com valores máximos e mínimos dos pesos e teste *post hoc* de Tukey para determinação de outliers ($n=10/\text{grupo}$); Letras diferentes sobre as colunas indicam diferenças estatísticas significantes; a: $P < 0,01$; b: $P < 0,0001$; c e d: $P < 0,05$; ANOVA e teste *post hoc* de Newman-Keuls ($P < 0,001$).

Tabela 3 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre a média do peso relativo da Bursa de Fabricius dos animais

Parâmetro	C	C/HS35	T	T/HS35	I	I/HS35
Peso Relativo (g/g) $\times 10^{-3}$	2,250 $\pm$ 0,447 ^a	1,549 $\pm$ 0,405 ^{a,b,c}	2,407 $\pm$ 0,503 ^{b,d}	2,116 $\pm$ 0,454 ^c	1,997 $\pm$ 0,421	1,790 $\pm$ 0,352 ^d

Notas: Os dados representam a média $\pm$ desvios padrão; Letras nos expoentes representam diferenças estatísticas significantes; a: $P < 0,01$; b: $P < 0,0001$; c e d: $P < 0,005$; ANOVA e teste *post hoc* de Newman-Keuls ($P < 0,001$).

5.4 Avaliação microscópica do baço e da bursa de Fabrício das aves

Os animais dos grupos que receberam manejo alimentar diferenciado (T e T/HS35) e aqueles infectados tiveram seus baços e bursas analisados por microscopia óptica, corados com HE.

Os órgãos foram observados em maior aumento (400x) para visualização da arquitetura tecidual (Figura 7); posteriormente, foi feita análise qualitativa dos órgãos empregando-se maior aumento (400x).

Figura 7 - Fotomicrografia de baço (A) e Bursa de Fabricius (B) de animais controles, aumento de 40x. Coloração HE

Fonte: (CALEFI, 2013).

O estresse por calor provocou uma aparente diminuição da região cortical dos folículos na bursa em relação àquelas dos animais dos grupos não estressados; foi observada, também, uma maior perda de definição da região corticomedular em alguns animais estressados. Os grupos I e I/HS35 apresentaram maior depleção linfóide medular nos folículos da bursa em relação aos dos grupos T e T/HS35, sendo a diferença intergrupo pouco evidente; porém, o grupo I/HS35 mostrou aumento significativo do espaço interfolicular com diminuição folicular em relação ao grupo I.

A análise do baço revelou discreta depleção linfóide em 40% animais submetidos à infecção. Não foram encontradas outras alterações que envolvessem a poupa branca. A poupa vermelha apresentou-se mais evidente no grupo I/HS35 em relação aos demais grupos; foi possível observar que este aumento ocorreu de forma discreta nos animais do grupo I em relação aos dos grupos que não foram infectados (C, C/HS35, T e T/HS35).

5.5 Avaliação macroscópica do proventrículo e da moela das aves

Durante o exame necroscópico, foi possível observar que os animais que receberam o caldo tioglicolado adicionado à ração (Grupos T, T/HS35, I e I/HS35)

apresentaram alterações macroscópicas no proventrículo e na moela (Figura 8). Os órgãos estavam aumentados, e o proventrículo apresentava coloração vermelho-escura heterogênea (Figura 8, A), na moela, após a retirada do conteúdo alimentar, pode-se observar áreas empalidecidas na mucosa (Figura 8, B). O proventrículo e a moela de todos os animais estavam repletos de alimento, já que não havia sido realizado jejum prévio dos animais.

Figura 8 - Fotografia macroscópica de animais que receberam tioglicolato na alimentação

Legenda: A – Fotografia mostrando aspecto externo do proventrículo e da moela; B – Fotografia mostrando o proventrículo e a moela após excisão. Fonte: (CALEFI, 2013)

5.6 Avaliação macroscópica do intestino delgado das aves

Os animais que receberam tioglicolato na alimentação sem infecção apresentaram o intestino discretamente mais avermelhado em relação aos dos grupos controles (C e C/HS35). Já os animais infectados apresentaram o intestino distendido por conteúdo gasoso e sua coloração era vermelho-purpúrea; a coloração tinha menor intensidade nos animais estressados.

Foi possível observar que os animais que receberam o tioglicolato apresentavam a mucosa avermelhada no duodeno, sendo a coloração do jejuno e do íleo de aspecto vermelho-róseo (Figura 9, B), mostrando-se esta mucosa discretamente alterada em relação àquele dos grupos controles (C e C/HS35).

Não foram observadas alterações macroscópicas entre os intestinos dos animais dos grupos controles (C e C/HS35).

Para examinar a mucosa dos animais infectados e determinar o escore macroscópico, foram colocadas sobre uma mesa limpa porções do duodeno, jejuno e íleo (Figura 10).

Figura 9 - Fotografia macroscópica mostrando toda a extensão da mucosa do intestino de animais do grupo T (B) e grupo I (A)

Fonte: (CALEFI, 2013)

Figura 10 - Fotografia macroscópica de secções dos duodenos, jejuno e íleo dos animais sobre a mesa para avaliação anatomopatológica

Fonte: (CALEFI, 2013)

Houve liberação do conteúdo gasoso, que distendia as alças, na abertura dos intestinos, liberando-se odor característico do gás produzido pelas cepas de *C. pefringens* inoculadas. O conteúdo intestinal permanecia repleto de bolhas, mais evidente nas porções do duodeno de todos os animais infectados (Figura 13 e Figura 15, B). Todos os animais infectados apresentaram alterações clínicas características de enterite necrótica aviária. A mucosa intestinal estava friável, rompendo-se com facilidade ao toque e, muitas vezes, em casos de animais com

escores de lesão mais altos, a serosa se destacava com a manipulação das porções intestinais. O contorno irregular da mucosa era facilmente visível no jejuno das aves (Figura 13: A), sendo observado também no íleo em casos mais graves da doença. O duodeno, de coloração vermelho intenso, continha conteúdo avermelhado com material fibrinoso. A produção de muco estava visivelmente aumentada (Figura 12: A e Figura 13: C, D e E). Placas esbranquiçadas com os bordos claros eram vistas com frequência nos duodenos (Figura 13: E), onde também se observaram placas negras ou brancas com contorno negro, indicativo de necrose (Figura 13: F e Figura 12: A). A parede intestinal era flácida, e tendia a não retornar à posição anatômica quando excisionada. Estava evidente a diminuição de espessamento da parede intestinal sendo que em alguns trechos podia ser visto o conteúdo na luz de aspecto fibrinoso, com característica de material descamativo. Em casos mais brandos da doença foi possível observar um espessamento da parede intestinal.

As alterações macroscópicas encontradas foram compatíveis com casos de enterite necrótica aviária provocadas por *C. perfringens* tipo A. Com base nos achados macroscópicos foi possível definir os escores lesionais para cada porção do intestino delgado. Como não foram encontradas lesões macroscópicas compatíveis com doenças intestinais nos demais grupos, somente foram mostrados os escores dos grupos infectados.

Ao se comparar os escores lesionais dos duodenos, foi possível observar que as aves do grupo I/HS35 apresentaram valores de escores macroscópicos mais baixos (+1 e +2) em relação às do grupo I (Figura 14) com menor mediana e primeiro quartil dos animais do grupo I/HS35 em relação ao grupo I. Os escores máximos e mínimos entre os grupos foram idênticos, não sendo encontrados animais com escore +4.

Figura 11 - Fotografia macroscópica de porções do duodeno

Legenda: Superfície da mucosa irregular, com aumento de muco e pontos de descolamento da serosa, apresentando coloração avermelhada. Observa-se no lumen do jejuno conteúdo repleto de bolhas, característico da proliferação do *C. perfringens* com a liberação de gás. Fonte: (CALEFI, 2013).

Figura 12 - Fotografia macroscópica do intestino de animais infectados

Legenda: A – Duodeno, mucosa avermelhada com aumento na produção de muco. Presença de placas enegrecidas (seta); B – Jejuno, diminuição na espessura da parede intestinal, com a presença de material fibrinoso e descamativo na luz intestinal (setas). Fonte: (CALEFI, 2013).

Quando comparados os escores macroscópicos atribuídos às porções do jejuno entre as aves dos grupos infectados, foi possível identificar que os animais não estressados apresentaram escores lesionais mais altos em relação aos do grupo estressado (Figura 15); porém, os valores interquartis foram idênticos. O grupo infectado sem estresse apresentou valor máximo de escore +3 e o grupo infectado estressado escore máximo +2. Os valores mínimos encontrados foram iguais entre os grupos.

Figura 13 - Fotografias macroscópicas intestinais de animais infectados

Legenda: A – Jejunio, presença de bolhas na luz intestinal e contorno irregular da mucosa (seta); B – Jejunio, conteúdo intestinal repleto de bolhas; C – Duodeno, mucosa avermelhada, com aumento de muco e material fibrinoso (setas); D – Duodeno, região com descolamento da serosa (seta), mucosa avermelhada com presença em abundância de material fibrinoso (ponta de seta) e de muco; E – Jejunio, regiões de descolamento da serosa com aumento na produção de muco, placas brancas. Presença de placas brancas arredondadas na mucosa (setas) e material fibrinoso em abundância, distribuição de petéqueas na mucosa; F – Duodeno, mucosa avermelhada, com áreas multifocais enegrecidas (setas). Fonte: (CALEFI, 2013)

Figura 14 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre o escore lesional macroscópico **no duodeno** dos animais infectados estressados

Legenda: Os resultados representam boxplots com valores máximos e mínimos dos escores (n=10/grupo); Análise empregando teste estatístico t e teste *post hoc* de Mann-Whitney (P=0,4726).

Figura 15 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre o escore lesional macroscópico **no jejuno** dos animais infectados

Legenda: Os resultados representam boxplots com valores máximos e mínimos dos escores (n=10/grupo); Análise empregando teste estatístico t e teste *post hoc* de Mann-Whitney (P=0,2698).

Os escores macroscópicos encontrados nos íleos, quando comparados os grupos, mostrou uma distribuição contrária ao que foi visto no duodeno e jejuno; o estresse por calor aumentou o número de animais com escore +1 em relação aos

animais do grupo não estressado. O resultado pode ser visualizado na figura 16 por valores maiores no 3º quartil do grupo I/HS35 em relação ao grupo I.

Figura 16 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre o escore lesional macroscópico **no íleo** dos animais infectados

Legenda: Os resultados representam boxplots com valores máximos e mínimos dos escores (n=10/grupo); Análise empregando teste estatístico t e teste post hoc de Mann-Whitney (P=0,1698).

5.7 Avaliação microscópica do intestino delgado das aves

A avaliação microscópica intestinal consistiu na visualização de secções correspondentes às porções do duodeno, jejuno e íleo coradas por HE. Foram utilizadas as colorações de Alcian blue e PAS para visualização da produção de muco e a coloração de Gram para identificação das características morfológicas e tintoriais das bactérias que se encontram aderidas às porções intestinais.

Foi possível observar, em menor aumento (40x), que os grupos C e C/HS35 não apresentaram alterações histológicas (Figura 17: A e B). Seguindo os mesmos critérios de análise descritos anteriormente, foi observado que os grupos T e T/HS35 apresentaram aumento na espessura dos vilos, sendo possível observar o frequente fusionamento de vilosidades com presença de GALTs e infiltrados inflamatórios (Figura 17: C e D). Foi visto com frequência nos animais do grupo I perda da arquitetura dos vilos com regiões extensas de fusionamento das vilosidades,

acompanhado por intenso infiltrado inflamatório, além de áreas com focos de infecção e aderência bacteriana no topo das vilosidades (Figura 17: E). Quando comparados os dados do grupo I/HS35 aos do grupo I, foi possível observar regiões compatíveis com a lesão provocada pela aderência bacteriana ao vilo; porém, o grupo estressado não apresentou fusinamento extenso dos vilos e infiltrado inflamatório extenso. As lesões encontradas nas porções distais do intestinos eram menos evidentes, ou seja, as alterações no íleo eram mais brandas em relação às encontradas no duodeno.

A determinação dos escore microscópico foi realizado por microscopia óptica com maior aumento (200x e 400x). As alterações histopatológicas encontradas em cada grupo foram descritas para a determinação do escore lesional microscópico para cada animal.

Para uma melhor compreensão dos achados microscópicos intestinais, segue uma descrição em tópicos das alterações encontradas em cada grupo e suas comparações entre os grupos estressados e não estressados:

- **Grupo C:** Não foram encontradas alterações histopatológicas. Animais considerados saudáveis (Figuras 20 e 21: A).
- **Grupo C/HS35:** Foi encontrado aumento discreto de heterófilos na lâmina própria em comparação ao grupo C; 30% dos animais apresentaram fusinamento de vilosidades focais (Figuras 20 e 21: B).
- **Grupo T:** Presença de congestão de discreta a moderada na lâmina própria em 70% dos animais, com fusinamento focal de vilo em 30% dos animais, predominando em duodeno, sendo raro em jejuno e íleo. Foi observado aumento discreto de heterófilos (+) em lâmina própria e vilos; aumento da dimensão das células caliciformes em relação ao grupo controle. Descamação do epitélio, predominando em topo de vilos em 60% dos animais. Muscular da mucosa se apresenta congesta. Necrose discreta em topo de vilosidades em 30% dos animais. Tecido apresenta aspecto edematoso, apresentando grau de enterite moderada. Proliferação linfoplasmocitária discreta a moderada (Figuras 18 e 19: C).

- **Grupo T/HS35:** Diminuição qualitativa evidente de heterófilos nos vilos e na lâmina própria; houve menor descamação do epitélio em relação ao grupo T; congestão discreta em 30% dos animais; tecido apresenta aspecto mais eosinofílico. Agregados linfóides proeminentes, porém raros; diminuição das criptas de Lieberkühn no duodeno; as características tendem à normalidade nas porções distais do intestino delgado. Necrose discreta a moderada em 40% dos animais, observando-se atrofia discreta em vilosidades do duodeno e jejuno; Aumento qualitativo de linfócitos interepiteliais. Muscular da mucosa apresenta-se congesta; células caliciformes proeminentes (Figuras 18 e 19: D).
- **Grupo I:** Distribuição difusa de heterófilos na lâmina própria e nos vilos (Figura 20: A). Fusionamento e atrofia de vilos proeminente, multifocal; descamação epitelial de moderada a grave. Células caliciformes proeminentes em relação aos grupos abordados anteriormente, porém com baixa produção de muco neutro e ácido em relação ao grupo I/HS35 (Figuras 24 e 27); aumento de infiltrado linfoplasmocitário com aumento de agregados linfóides (Figura 20: B), e rarefação celular nos núcleos linfóides. Necrose moderada multifocal; presença de bacilos Gram positivos na luz intestinal e focos de infecção predominante em topo de vilosidades com processo inflamatório acentuado (Figuras 21, 23 e 24). Perda de arquitetura tecidual; espessamento de serosa com pontos de ruptura (Figuras 18 e 19: E).
- **Grupo I/HS35:** Aumento das células caliciformes em relação ao grupo I; diminuição da descamação do epitélio em relação ao grupo I. Diminuição qualitativa de heterófilos, assemelhando-se ao grupo T/HS35, apresentando migrações focais próximas a processos infecciosos, porém menos acentuados em relação ao grupo I. Presença de infiltrados linfoplasmocitários (Figura 20: B); produção de muco neutro acentuado (Figura 22); presença de bacilos Gram positivos em luz intestinal e focos de infecção predominante em topo de vilosidades com processo inflamatório discreto (Figuras 21, 23 e 24). Necrose discreta, com fusionamento de vilosidades; aumento das criptas de Lieberkühn no duodeno. Congestão semelhante ao encontrado nos grupos T

e T/HS35; espessamento de serosa com pontos de ruptura (Figuras 18 e 19: F).

Com os escores determinados, foi possível comparar os efeitos do estresse por calor nos diferentes grupos com relação às porções do intestino delgado. Quando comparados os intestinos delgados, foi possível observar um maior número de animais com escore +1 no grupo T/HS35 em relação ao grupo T, porém tal diferença não foi estatisticamente significativa. Ao se comparar os grupos infectados, foi possível observar que o estresse por calor produziu menores valores de escores lesionais em relação aos medidos no grupo não estressado; tal resultado pode ser visto pela menor mediana e 3º quartil (Figura 26). O grupo T apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo I ($P < 0,0001$) e I/HS35 ($P < 0,001$); o mesmo ocorreu com o grupo T/HS35 em relação aos animais infectados ($P < 0,001$ e $P < 0,05$; Figura 27).

Figura 17 - Fotomicrografias representativas do duodeno das aves

Legenda: Fotografias sob aumento de 400x; A – Grupo C; B – Grupo C/HS35; C – Grupo T; D – Grupo T/HS35; E – Grupo I; F – Grupo I/HS35. Coloração de HE. Fotografias A e B mostram característica normal dos vilos; Fotografias C e D mostram espessamento das vilosidades (ponta de seta) e fusão na base dos vilos com presença de infiltrado inflamatório associado ao GALT (seta); Fotografias E mostra o fusionamento extenso das vilosidades acompanhado de intenso infiltrado inflamatório, com presenças de agregados linfoides (ponta de seta) e pontos de infecção e aderência bacteriana aos topos dos vilos (seta); Fotografia F mostra processo infeccioso bacteriano em topo de vilosidade. Fonte: (CALEFI, 2013).

Figura 18 - Fotomicrografias representativas dos vilos do duodeno das aves

Legenda: Fotomicrografias sob aumento de 400x; (A) Grupo C; (B) Grupo C/HS35; (C) Grupo T; (D) Grupo T/HS35; (E) Grupo I; (F) Grupo I/HS35. Coloração de HE. Fotografias A e B mostram vilos normais, presença de microvilos, com integridade do epitélio, distribuição normal de linfócitos interepiteliais e heterófilos raros; Fotografia C, com tecido mais basofílico, aumento da dimensão das células caliciformes com início de desarranjo da superfície epitelial (setas); fotografia D, tecido normal; Fotografia E, processo infeccioso (seta) com a presença de necrose e bactérias pleomórficas em forma de bastonete no ápice do vilo, intenso infiltrado polimorfonuclear (heterófilos – ponta de setas); Fotografia F, presença de processo infeccioso com focos de necrose, infiltrado polimorfonuclear discreto (heterófilos – ponta de seta). Fonte: (CALEFI, 2013).

Figura 19 - Fotomicrografias representativas das criptas do duodeno das aves

Legenda: Fotomicrografias sob aumento de 400x; A – Grupo C; B – Grupo C/HS35; C – Grupo T; D – Grupo T/HS35; E – Grupo I; F – Grupo I/HS35. Coloração de HE. Fotografia A mostra lâmina basal normal; Fotografia B mostra lâmina basal normal com discreto aumento de heterofilos; Fotografia C, com tecido mais basofílico, aumento de células caliciformes (setas) e criptas de Lieberkühn; Fotografia D, tecido tendendo a normalidade com discreto fusionalmento das criptas (seta); Fotografia E, presença de infiltrado linfoplasmocitário e polimorfonuclear moderado (seta), perda de arquitetura tecidual; Fotografia F, aumento das criptas de Lieberkühn, congestão discreta da lâmina basal e aumento discreto de células produtoras de muco. Fonte: (CALEFI, 2013)

Figura 20 - Fotomicrografia de infiltrado linfoplasmocitário e polimorfonuclear no duodeno de frango de corte

Legenda: Fotomicrografias sob aumento de 400x (A) e 200x (B); A – Infiltrado linfoplasmocitário e infiltrado polimorfonuclear, com predomínio de heterófilos (seta); B – Infiltrado linfoplasmocitário e agregado linfoide (seta) em lâmina basal do intestino. Coloração HE. Fonte: (CALEFI, 2013).

Figura 21 - Fotomicrografia de infecção bacteriana no intestino de ave submetida a infecção por *C. perfringens*

Legenda: Fotomicrografias **do duodeno**, com aumento de 400x. Processo infeccioso bacteriano em topo de vilosidade. Presença de bactérias em abundância com tecido necrótico (ponta de seta); Infiltrado linfoplasmocitário com predomínio de infiltrado polimorfonuclear com material particulado no citoplasma. Coloração HE.

Figura 22 - Fotomicrografias do duodeno das aves para avaliação da produção de muco neutro

Legenda: Fotomicrografias sob aumento de 100x (A e B) e 400x (C, D, E e F); A, C e E – Grupo I; B, D e F – Grupo I/HS35; Evidente produção de muco neutro aumentada em grupo estressado (direita) em relação a grupo não estressado (esquerda), as diferenças são evidenciadas pela coloração rósea (setas) do muco nas células caliciformes dos vilos (A, B, E e F) e lâmina basal (C e D). Coloração PAS. Fonte: (CALEFI, 2013).

Figura 23 - Fotomicrografia para visualização de bactérias aderidas aos vilos

Legenda: Fotomicrografias do duodeno, com aumento de 40x (A) e 100x (B); Presença de bactérias Gram positivas em topo de vilosidade intestinal (setas). Coloração de Gram. Fonte: (CALEFI, 2013)

Figura 24 - Fotomicrografia de duodeno de ave infectada

Legenda: Fotomicrografias do duodeno, com aumento de 1000x; Presença de bastonetes, gram positivos, pleomórficos aderidos à superfície do vilo, indicativo da infecção por *C. perfringens*. Coloração de Gram. Fonte: (CALEFI, 2013).

Figura 25 - Fotomicrografias representando produção de muco ácido no duodeno das aves

Legenda: Fotomicrografias sob aumento de 100x; A – Grupo C; B – Grupo C/HS35; C – Grupo T; D – Grupo T/HS35; E – Grupo I; F – Grupo I/HS35; Comparação entre os grupos para produção de muco ácido no duodeno. O muco ácido está corado de cor azul intenso. Coloração de Alcian Blue. Fonte: (CALEFI, 2013).

Figura 26 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre o escore lesional microscópico no duodeno dos animais

Legenda: Os resultados representam boxplots com valores máximos e mínimos dos escores microscópicos do duodeno (n=10/grupo); Letras diferentes sobre as colunas indicam diferenças estatísticas significantes; a: $P<0,0001$; b e c: $P<0,001$; d: $P<0,05$; ANOVA e teste *post hoc* de Newman-Keuls ($P<0,0001$).

Quaisquer diferenças entre os grupos T e T/HS35 nos duodenos desapareceram no jejuno e íleo. Desta forma, os resultados dos escores foram semelhantes nos jejunos e íleos analisados, sendo eles pouco influenciados pelo estresse por calor.

Os animais dos grupos T e T/HS35 apresentaram redução significativa dos escores de lesão observados no jejuno em relação aos do grupo I ($P<0,001$). Mais especificamente, observamos que o mesmo não se deu em relação ao grupo I/HS35 por apresentarem as aves deste grupo resultados escores mais baixos, com primeiro quartil partindo do escore 0, fato não apresentado no grupo I (Figura 27). Ou seja, o estresse por calor produziu menor escore lesional no jejuno nos animais infectados.

Figura 27 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre o escore lesional microscópico no jejuno dos animais

Legenda: Os resultados representam boxplots com valores máximos e mínimos dos escores microscópicos do duodeno (n=10/grupo); Letras diferentes sobre as colunas indicam diferenças estatísticas significantes; a e b: $P < 0,001$; ANOVA e teste *post hoc* de Newman-Keuls ($P < 0,0005$).

Os efeitos do estresse por calor, que até então produziram menores valores de escores, foram diferentes no íleo dos animais analisados. Mesmo não ocorrendo diferença estatística significativa entre os dados dos grupos I e I/HS35, foi possível observar que o valor máximo de escore no grupo I/HS35 foi +2, enquanto no grupo I, não ultrapassou o escore +1 (Figura 28). No íleo, os grupos T e T/HS35 apresentaram diferenças significantes em relação aos dos grupos I e I/HS35 ($P < 0,05$).

Figura 28 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre o escore lesional microscópico no íleo dos animais

Legenda: Os resultados representam boxplots com valores máximos e mínimos dos escores microscópicos do duodeno (n=10/grupo); Letras diferentes sobre as colunas indicam diferenças estatísticas significantes; a, b, c e d: $P < 0,05$; ANOVA e teste *post hoc* de Newman-Keuls ($P < 0,001$).

5.8 Imunoistoquímica para identificação de linfócitos B no intestino delgado (duodeno e jejuno)

As reações de imunoistoquímica realizadas em cortes do duodeno e do jejuno visaram a marcação de linfócitos B, para a identificação da distribuição dos linfócitos e plasmócitos encontrados nos infiltrados linfoplasmocitários.

Não foram encontradas diferenças na distribuição de linfócitos B e plasmócitos nos infiltrados linfoplasmocitários das aves dos grupos infectados. O estresse por calor não alterou a distribuição dos linfócitos marcados entre as aves dos grupos infectados e que receberam caldo tioglicrato sem bactéria.

Em virtude da distribuição de agregados linfoides associados a mucosa (GALT), foi possível obter o controle positivo interno da reação (Figura 29).

Figura 29 - Fotomicrografia do intestino submetido a técnica imunoistoquímica para identificação de linfócitos e plasmócitos

Legenda: Fotomicrografias do duodeno, com aumento de 1000x (A e B) e 200x (C, D, E e F); Fotografia A mostrando marcação de linfócitos em GALT; Fotografia B mostra a marcação de linfócitos B em lâmina basal de animais não infectado; Fotografias C, D, E e F mostrando a marcação dos linfócitos nos folículos linfoides (setas) associados a mucosa intestinal e linfócitos presentes em infiltrado linfoplasmocitário de animais infectados. Contracoloração com hematoxilina; Revelação da reação com DAB. Fonte: (CALEFI, 2013).

5.9 Quantificação dos níveis séricos de corticosterona

A quantificação de corticosterona foi realizada em todos os grupos de animais.

O estresse por calor aumentou os níveis de corticosterona apenas nos animais do grupo C/HS35 em relação aos do grupo C, sendo a diferença considerada estatisticamente significativa ($P < 0,05$). Quando comparados os dados dos grupos estressados T/HS35 e I/HS35 em relação aos respectivos grupos não estressados (T e I), foi observada menor concentração de corticosterona sérica nas aves dos grupos T/HS35 e I/HS35, demonstrado por diminuição da mediana e valores interquartis (Figura 30).

O grupo I/HS35 apresentou maior homogeneidade de dados em relação aos dos demais grupos, demonstrado pelo menor desvio padrão (Tabela 4) e pelos valores máximos e mínimos próximos ao 1º e 3º quartis.

A média da concentração de corticosterona das aves do grupo T/HS35 apresentou resultados próximos à normalidade (Tabela 4), tendência que pode ser acompanhada pelo grupo I/HS35.

Tabela 4 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre a média da concentração de corticosterona sérica nos diferentes grupos.

Parâmetro	C	C/HS35	T	T/HS35	I	I/HS35
Concentração (pg/ml)	1451,04 ^a	3390,47 ^a	2838,08	1556,81	3458,51	2394,55
Desvio Padrão	±1234,69	±1396,79	±1933,51	±1392,84	±2081,98	±835,19

Nota: Os dados representam a média ± desvios padrão. a: $P < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn para correção das comparações entre grupos ($P < 0,01$).

Figura 30 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre os níveis plasmáticos de corticosterona dos animais

Legenda: Os resultados representam boxplots com valores máximos e mínimos dos níveis séricos de corticosterona e teste post hoc de Tukey para determinação de outliers (n=10/grupo); • Animal *outlier* segundo teste de Tukey; As letras sobre as caixas representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos; a: $P < 0.05$; Teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn para correção das comparações entre grupos ($P < 0,01$).

5.10 Quantificação dos níveis séricos de IgA, IgM e IgY

A quantificação das imunoglobulinas séricas foi realizada em todos os animais. Os resultados foram comparados entre os grupos e expressos em gráfico (Figura 33) e em tabela (Tabela 5).

Ao se analisar os resultados da quantificação de IgA, observam-se discretos valores menores na concentração de IgA nos animais estressados por calor em relação aos animais de mesmo tratamento sem estresse (Grupos C, C/HS35, I e I/HS35). As tendências podem ser visualizadas por menores valores do 3º quartil do grupo C/HS35 em relação ao grupo C e por diminuição da média (Tabela 5) e mediana do grupo I/HS35 em relação ao grupo I.

Os animais dos grupos T e T/HS35 apresentaram valores semelhantes na concentração de IgA, com diferenças estatísticas significativamente menores em relação ao grupo I ($P < 0,05$). Os valores apresentados foram muito inferiores aos dos demais grupos (Figura 31 e Tabela 5).

Os resultados de IgA séricos foram estatisticamente diferentes entre os grupos ($P < 0,0001$).

Figura 31 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre os níveis plasmáticos de IgA nos diferentes grupos

Legenda: Os resultados representam boxplots com valores máximos e mínimos dos ($n=10$ /grupo); As letras sobre as caixas representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos; a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$. Teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn para correção das comparações entre grupos ($P < 0,0001$).

Tabela 5 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre a média da concentração sérica de IgA nos animais

Parâmetro	C	C/HS35	T	T/HS35	I	I/HS35
Concentração (µg/ml)	596,77	602,53	201,36 ^a	210,31 ^b	941,56 ^{a,b}	740,51
Desvio Padrão	±563,10	±504,45	±56,34	±66,13	±638,34	±667,76

Nota: Os dados representam a média $\pm$ desvios padrão; Letras nos expoentes representam diferenças estatísticas significantes; a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$. Teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn para correção das comparações entre grupos ($P < 0,0001$).

Quando analisadas as concentrações de IgM, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ($P=0,116$). No entanto, foi possível observar uma tendência de aumento da concentração de IgM nos animais estressados dos grupos C/HS35 e I/HS35 em relação aos animais não estressados com mesmo tratamento, representados por aumento nos valores do 3º quartil (Figura 32) e médias (Tabela 6). Por outro lado, o grupo T/HS35 apresentou uma tendência a diminuição na concentração de IgM em relação ao grupo T, representado por uma diminuição do valor do 1º quartil e tendência aos valores de normalidade

representados pelo grupo C (Figura 34). Os resultados dos grupos mostraram diferenças estaticamente significantes ($P < 0,0001$).

Figura 32 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre os níveis plasmáticos de IgM nos diferentes grupos

Legenda: Os resultados representam boxplots com valores máximos e mínimos dos ($n=10$ /grupo); ANOVA de uma via e teste post hoc de Tukey ($P=0,116$).

Tabela 6 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre a média da concentração sérica de IgM nos animais

Parâmetro	C	C/HS35	T	T/HS35	I	I/HS35
Concentração (µg/ml)	393,43	435,14	523,49	425,25	516,90	631,33
Desvio Padrão	±126,58	±221,47	±141,52	±197,22	±201,21	±281,11

Nota: Os dados representam a média $\pm$ desvios padrão; ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Tukey ($P=0,116$).

As quantificações de IgY mostraram distribuições semelhantes entre os grupos, com exceção do grupo T, que apresentou diferença estatística significativa (para mais) quando comparado ao grupo C ($P < 0,01$), C/HS35 ($P < 0,001$), I ($P < 0,05$) e I/HS35 ($P < 0,05$). Os resultados foram estaticamente significantes ($P < 0,0001$).

Existe a possibilidade de o estresse por calor ter desencadeado uma discreta diminuição na concentração de IgY nos animais dos grupos estressados em relação aos do não estressados, o que pode ser observado pela presença de valores mínimos inferiores em todos os grupos estressados em relação aos respectivos

grupos não estressados (Figura 33) e discreta diminuição na média dos valores (Tabela 7).

Figura 33 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre os níveis plasmáticos de IgY nos diferentes grupos

Legenda: Os resultados representam boxplots com valores máximos e mínimos dos ($n=10$ /grupo); As letras sobre as caixas representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos; a: $P<0.01$; b: $P<0.0001$; c e d: $P<0,05$; Teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn para correção das comparações entre grupos ($P<0,0001$).

Tabela 7 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre a média da concentração sérica de IgY nos animais

Parâmetro	C	C/HS35	T	T/HS35	I	I/HS35
Concentração (µg/ml)	684,34	547,64	1150,64	707,18	691,64	677,68
Desvio Padrão	±193,00	±131,36	±288,32	±112,17	±136,24	±98,58

Nota: Os dados representam a média $\pm$ desvios padrão; Letras nos expoentes representam diferenças estatísticas significantes; a: $P<0.01$; b: $P<0.0001$; c e d: $P<0,05$; Teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn para correção das comparações entre grupos ($P<0,0001$).

5.11 Quantificação dos níveis de IgA no lavado intestinal

As quantificações de IgA foram realizadas em porções do duodeno e do jejuno e foram analisadas isoladamente. Os resultados foram comparados entre os grupos e expressos em gráfico (Figura 34) e em tabela (Tabela 8).

O estresse por calor produziu menor concentração de IgA no lavado intestinal das aves do grupo T em relação às do grupo T/HS35 ($P<0,05$). Os animais do grupo C/HS35 apresentaram menores concentrações de IgA no lavado do duodeno quando comparados aos do grupo C. As mesmas tendências se refletiram na diminuição dos valores médios de cada grupo (Tabela 8). A mesma tendência não ocorreu no grupo de animais infectados, sendo que o grupo estressado apresentou discreto aumento da concentração de IgA em relação ao grupo sem estresse, fato representado por diminuição do valor do 3º quartil (Figura 34).

Foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os animais do grupo C/HS35 que foram menores em relação aos dos grupos T ($P<0,0001$), I ($P<0,001$) e I/HS35 ($P<0,0001$); as aves do grupo T em relação às do grupo T/HS35 ($P<0,05$); e as aves do grupo I em relação ao grupo I/HS35 ($P<0,05$). Os resultados entre os grupos mostraram diferenças estatisticamente significantes ($P<0,0001$).

Figura 34 - Efeito dos tratamentos experimentais sobre os níveis de IgA no lavado do duodeno

Legenda: Os resultados representam boxplots com valores máximos e mínimos dos níveis séricos de corticosterona e teste *post hoc* de Tukey para determinação de outliers ($n=10/\text{grupo}$); • Animal *outlier* segundo teste de Tukey; As letras sobre as caixas representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos; a e c: $P<0,0001$; b: $P<0,01$; d e e: $P<0,05$; Teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn para correção das comparações entre grupos ($P<0,0001$).

Tabela 8 - Efeito dos tratamentos experimentais sobre os níveis de IgA no lavado do duodeno

Parâmetro	C	C/HS35	T	T/HS35	I	I/HS35
Concentração (ng/ml)	715,81	264,63 ^{a,b,c}	1435,40 ^{a,d}	481,26 ^{d,e}	1006,24 ^b	1316,93 ^{c,e}
Desvio Padrão	±544,07	±160,93	±1131,41	±235,54	±380,24	±888,87

Nota: Os dados representam a média $\pm$ desvios padrão; Letras nos expoentes representam diferenças estatísticas significantes; a e c: $P < 0,0001$; b: $P < 0,01$; d e e: $P < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn para correção das comparações entre grupos ($P < 0,0001$).

Os resultados encontrados no jejuno confirmam as tendências de diminuição ou não aumento da concentração de IgA intestinal provocados pelo estresse por calor. A mesma tendência foi apresentada no grupo de animais infectados, refletindo-se este fato para diminuição dos valores médios, mediana e 3º quartil em relação ao grupo sem estresse (Figura 35 e Tabela 9).

Foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os aves do grupo C/HS35 em relação às do grupo T ($P < 0,0001$) e do grupo T em relação às aves dos grupos T/HS35 ($P < 0,05$) e I/HS35 ($P < 0,05$). Os resultados mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($P < 0,0001$).

Figura 35 - Efeito dos tratamentos experimentais sobre os níveis de IgA no lavado do jejuno dos diferentes grupos

Legenda: Os resultados representam boxplots com valores máximos e mínimos dos níveis séricos de corticosterona e teste *post hoc* de Tukey para determinação de *outliers* ($n=10/\text{grupo}$); As letras sobre as caixas representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos; a: $P < 0,0001$; b e c: $P < 0,05$; ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Tukey para correção das comparações entre grupos ($P < 0,0001$).

Tabela 9 - Efeito dos tratamentos experimentais sobre os níveis de IgA no lavado do jejuno

Parâmetro	C	C/HS35	T	T/HS35	I	I/HS35
Concentração (ng/ml)	4823,55	2541,81 ^a	7243,32 ^{a,b,c}	3595,74 ^b	5244,80 ^b	3923,46 ^c
Desvio Padrão	±2305,64	±2370,29	±1639,26	±2127,10	±2162,14	±3029,59

Nota: Os dados representam a média $\pm$ desvios padrão; Letras nos expoentes representam diferenças estatísticas significantes; a: $P < 0,0001$; b e c: $P < 0,05$; ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Tukey para correção das comparações entre grupos ($P < 0,0001$).

4 DISCUSSÃO

Os modelos de enterite necrótica aviária presentes na literatura utilizam, em sua grande maioria de coinfeção com patógenos como, por exemplo, *Eimerias*. Estas co-infeções facilitam a instalação e o desenvolvimento clínico da infecção pelo *C. perfringens* tipo A (AL-SHEIKHLY, 1980; SHANE et al., 1985). Mesmo assim, ainda existe alguma dificuldade na reprodução da infecção como observada no campo. O presente modelo que empregou uma dieta como fator predisponente, foi eficaz em reproduzir a doença sem a necessidade de desafiar os animais com um segundo patógeno.

Diferentemente do observado por Cooper e Songer (2010), o modelo experimental presentemente usado produziu a infecção com desenvolvimento clínico em todos os animais testados, sem a necessidade adicional de submete-los a um jejum alimentar. No entanto, para atingir este objetivo foi necessário aumentar o período experimental em três dias em relação ao modelo da literatura. O jejum não era desejável em nosso estudo, pois seria um estressor adicional aplicado durante a fase de experimentação.

A diversidade de modelos, relacionados à manipulação da alimentação das aves, descrita na literatura está ligada às diferentes formulações de rações, ao emprego de agentes infecciosos concomitantes, às vias de administração e aos meios utilizados quando do fornecimento da bactéria às aves (AL-SHEIKHLY; TRUSCOTT, 1977; DAHIYA et al., 2006; KEYBURN et al., 2008; COOPER; SONGER, 2010). Dentre estas medidas, aquelas que empregam alterações na formulação da ração ou associação de infecção concomitante por coccídias são os principais modelos experimentais encontrados na literatura.

Em nosso experimento valemo-nos da adição de proteína de origem animal e do aumento do teor de proteína bruta na formulação da ração; esta adição auxilia o desenvolvimento do *C. perfringens* na luz intestinal das aves ao desequilibrar o microambiente intestinal (TRUSCOTT; AL-SHEIKHLY, 1977; WILLIAMS et al., 2003). Destaca-se neste momento, que o caldo tioglicolato, no qual as bactérias foram cultivadas e usado como veículo para introduzi-las no organismo das aves é

uma substância quimiotática, utilizada experimentalmente para estimular a migração de polimorfonucleares em mamíferos (NATHAN; ROOT, 1977; SEGAL et al., 2002).

De fato, o potencial inflamatório do caldo tioglicolato e sua ação irritativa na mucosa intestinal foi claramente observado neste trabalho pois gerou um quadro de enterite discreta, ao exame macroscópico e histopatológico da mucosa intestinal. Deste modo, a presença da substância na luz intestinal, por si só, pode ser considerada irritante em virtude das lesões que produziu. Este efeito, inerente à infecção experimental produzida, tornou-se desejável, pois facilitou a ação das toxinas liberadas pelas bactérias, bem como a adesão bacteriana pela lesão epitelial que produziu ao comprometer as barreiras físicas intestinais (MCCLANE, 1996; CRAVEN, 2000; COOPER et al., 2010).

Quer nos parecer que todos os componentes adicionados neste trabalho à ração foram importantes para o desenvolvimento da doença, o que compensou a ausência de co-infecção por coccídias, um dos principais fatores associados no campo ao desenvolvimento da NE. Os resultados do estresse por calor em um modelo que utilizasse ambos patógenos estariam atrelados a uma resposta desencadeada por esses agentes etiológicos, tornando-se mais especulativa a análise do efeito do estressor sobre o desenvolvimento individual de cada uma das etiologias (AL-SHEIKHLY; AL-SAIEG, 1980; GOLDER et al., 2011). Em contrapartida, o potencial irritativo do caldo tioglicolato facilitou a instalação da NE; além disso, observou-se no presente trabalho que a moela e o proventrículo também apresentaram alterações macroscópicas, indicativas da capacidade irritativa do tioglicolato em outras regiões do trato gastrointestinal. Tais alterações sugerem uma disfunção ou ineficiência em alguns dos processos digestivos das aves, o que diminuiria a qualidade do bolo alimentar que chegaria ao duodeno, fato que poderia ter contribuído para o desequilíbrio da fisiologia intestinal associado à má absorção de nutrientes.

Quer nos parecer também que as alterações descritas acima teriam desencadeado um desbalanço na microbiota intestinal. Sendo assim, haveria maior probabilidade de as bactérias patogênicas ou comensais aderirem à mucosa e se multiplicarem desordenadamente. As consequências imunes e neurais deste desbalanço microbiológico intestinal poderiam, por sua vez, tornar-se um fator relevante modulador neuroimune sistêmico (GRENHAM et al., 2011).

Os animais que receberam o caldo tioglicolato (T e T/HS35) e/ou foram infectados (I e I/HS35) apresentaram menor ganho de peso corporal durante o período experimental em relação aos do grupo C. Por sua vez, o estresse por calor, aplicado às aves do grupo controle estressado (C/HS35), diminuiu o ganho de peso das mesmas, mas esta diferença intergrupo não se refletiram nas aves dos demais grupos (T em relação a T/HS35 e I em relação a I/HS35). Desta forma, quer nos parecer que o estresse não exacerbe a irritação provocada pelo tioglicolato e não aumente as lesões produzidas pelo clostrídio. Desta forma, o calor torna-se um fator de baixo impacto na variação intergrupo sobre o consumo de ração e/ou sobre absorção dos nutrientes nos animais que receberam o tioglicolato e/ou foram infectados. Estes fatos, por sua vez, teriam refletido nas variações discretas observadas nos pesos corporais entre os animais estressados e não estressados.

O calor por si provoca uma diminuição no consumo de alimento como forma de reduzir o incremento calórico produzido pela alimentação (QUINTEIRO-FILHO et al., 2012). Com a perda de calor dificultada, o animal se valeria de mecanismos compensatórios para evitar a hipertermia, o que contribuiria para uma menor perda energética em função do esforço despendido com hiperventilação e compensação cardíaca. Somando-se a estes fatos, o efeito do caldo tioglicolato sobre o trato gastrintestinal e em especial sobre, a mucosa intestinal e aqueles decorrentes da lesão desencadeada pela bactéria, é possível interferir que uma redução da absorção de nutrientes pelas aves tenha contribuído para a observação do menor ganho de peso nos animais estressados C/HS35 em relação aos do grupo C (controle).

A acentuada diminuição do ganho de peso corporal das aves do grupo C/HS35 em relação às do grupo C não foi observada de forma igual nos demais grupos estressados (T/HS35 e I/HS35). Em relação aos grupos T e I, respectivamente, observamos que as aves dos grupos T/HS35 e I/HS35 tiveram discreta redução de peso corpóreo, reduções estas que não chegaram a ser significantes. Esta menor diferença pode ser explicada pelo incremento proteico da ração fornecidas aos animais, em função da adição da farinha de peixe. Este fato poderia ter mascarado o efeito do estresse por calor sobre o ganho de peso dos grupos que receberam o caldo tioglicolato (T e T/HS35) e/ou foram infectados (I e

I/HS35), uma vez que a diminuição da absorção poderia ter sido compensada pela maior disponibilidade de nutrientes, principalmente proteínas, na luz intestinal.

Conforme esperado, em virtude do grau de lesão intestinal, os animais infectados (I e I/HS35) apresentaram menor ganho de peso durante a fase experimental em relação aos dos demais grupos.

A constituição da microbiota intestinal é de extrema relevância. Quer nos parecer que os animais utilizados em nossos experimentos apresentavam uma diferente composição das populações bacterianas em relação àquela de animais criados em granjas comerciais. As bactérias anaeróbias facultativas são os principais tipos a colonizar os intestinos. Quando o animal é introduzido em uma granja, estas populações vão se estabilizando e as bactérias anaeróbias estritas passam a colonizar e a se destacar na microbiota intestinal (PALMER et al., 2007). Em nosso trabalho, os animais foram alojados em isoladores após o nascimento, um ambiente que passou por desinfecção; ou seja, durante toda a fase experimental, estes animais não foram desafiados com uma carga bacteriana compatível àquela que seria encontrado a campo (CRESSMAN et al., 2010). Tal achado foi confirmado no cultivo microbiológico das fezes; observou-se apenas uma população de anaeróbios com excessão do *C. perfringens*, o que contrasta com o crescimento de múltiplos gêneros bacterianos em animais criados em condições normais de campo (SINGH et al., 2012). Dessa forma, quer nos parecer seja possível ressaltar a influência da baixa diversidade da microbiota anaeróbia em nossos resultados. Um animal “livre de microbiota intestinal” (*germ free*) apresenta deficiência na maturação do sistema imune, alterações comportamentais e problemas absorptivos (MCCRACKEN; LORENZ, 2001; SINGH et al., 2012). Da mesma forma, espera-se que animais SPF, quando inseridos em isoladores ao primeiro dia de vida, apresentem um mesmo padrão de maturação imune e de absorção durante o desenvolvimento, diferentemente do que é encontrado em animais criados em condições convencionais.

O estresse por calor produz alterações comportamentais semelhante àsquelas observadas em animais que apresentam comportamento doentio, como descrito por Besedovsky (1996). A apatia foi maior, em nosso trabalho, nos animais que receberam o tioglicolato ou a bactéria na alimentação. Este tipo de comportamento associado ao estresse por calor pode ser interpretado como associado ao padrão de

expressão comportamental de aves frente a um estímulo estressor ou, alternativamente ser tomado como reflexo da ativação de mecanismos compensatórios para a perda de calor. Quer nos parecer que, associar o comportamento desencadeado pelo calor como um comportamento doentio seja incorreto, uma vez, que os animais do grupo C/HS35 não possuem uma doença associada. Assim, parece-nos que os efeitos induzidos pelo calor em animais saudáveis (grupo C/HS35) estejam ligados mais diretamente a uma regulação do sistema nervoso para compensação da hipertermia. Desta forma, a ação do calor ocorreria diretamente no sistema nervoso central e não seria regulada por citocinas liberadas, por exemplo, por um estímulo inflamatório como proposta para o comportamento doentio. De fato nossos achados histológicos não mostraram alterações acentuadas no sistema imune dos animais saudáveis que foram estressados (C/HS35). Assim, por não se ter verificado qualquer grau de enterite nos animais do grupo C/HS35, pode-se inferir que a principal via de ação do estresse por calor tenha sido o sistema nervoso. Uma vez que a percepção do calor depende da sensibilidade periférica e central do sistema nervoso, torna-se evidente a participação deste sistema como o primeiro a desencadear os reflexos neuroimunomodulatórios.

Relações entre resposta imune inata e do SI como um todo, via ativação de receptores *Toll-like* em mastócitos, durante um processo inflamatório ou lesivo intestinal, têm impacto direto na atividade do eixo cérebro-mucosa-microbiota (GRENHAM et al., 2011). O reflexo da ativação deste eixo se faz quer no local ou sistemicamente. Desta forma, não deve ser ignorado o envolvimento do eixo cérebro-mucosa-microbiota com as alterações encontradas nos animais deste trabalho. Ressalte-se neste sentido, a influência da distensão gasosa das alças intestinais produzida pelo *C. perfringens*, fato indicativo da presença nas aves de dor visceral, como a descrita em humanos (VAN DIEST et al., 2012; NICOTRA et al., 2012). Quer nos parecer, seja possível inferir que a dor e a distensão gasosa das vísceras acabe por limitar a ingestão de alimentos, levando à queda de performance.

Mostrou-se que o estresse por calor modula a dor por ativação do SNC, e que a termorregulação central, isolada, e sua consequente ativação neural não foi capaz de modular a sensibilidade à dor, porém o estresse diminui a nocicepção (FECHIR et al., 2009). Se é assim, então é possível sugerir que o estresse por calor tenha

mascarado nas aves, em algum nível, a alteração na percepção da dor visceral produzida pela distensão gasosa e lesão do epitélio intestinal. Com tais inferências, cabe-nos questionar se a diminuição na percepção dolorosa teria sido suficiente para desencadear respostas neuroimunológicas.

As importantes alterações fisiológicas desencadeadas pelo calor parecem ter influenciado de forma acentuada o peso relativo da Bursa de Fabricius dos animais. De fato, as bursas das aves do grupo C/HS35 mostraram-se com peso relativo menor que aquele medido nos animais do grupo C. Algumas ideias associadas parecem explicar este efeito: 1 – presença de hipoplasia; 2 – presença de hipotrofia; 3 – diminuição no volume hídrico do órgão.

O exame histopatológico da Bursa nos animais infectados e estressados, revelou diminuição das áreas corticais dos folículos, que correspondem à maior área da bursa e, ao mesmo tempo aumento do espaço interfolicular, fatos não evidenciados nas aves dos demais grupos. A alteração no espaço interfolicular relaciona-se principalmente à contração ou relaxamento da musculatura lisa da Bursa. Neste sentido, torna-se difícil inferir este efeito nos animais avaliados, uma vez que a morte dos animais influencia a contratilidade muscular. Outra alternativa para explicar o achado seria atribuir estas diferenças a alteração do tamanho dos folículos; esta possibilidade necessitaria de comprovação experimental por meio de uma análise morfométrica mais acurada da bursa (ROMPPANEN, 1982).

Considerando-se a diminuição dos folículos da bursa, independentemente da contração muscular, pode-se propor duas teorias explicativas para este efeito: a primeira propõe que o estresse por calor retarde a maturação do sistema linfóide que se completa próximo ao 21º dia de vida. Esta hipótese é sustentada pela observação da diminuição da definição corticomedular dos grupos, associada tanto à diminuição da diferenciação das células foliculares como à depleção linfóide. Uma segunda teoria sugere uma contribuição da migração de linfócitos B da bursa para o intestino; essas células seriam necessárias nos sítios em que se encontram os patógenos e/ou os fatores irritantes. A segunda teoria tem pouca sustentação; neste trabalho observamos que as diferenças nos pesos relativos das bursas foram acentuados dos grupos C em relação às do grupo C/HS35, ou seja, a alteração foi independente do processo infeccioso ou inflamatório, que recrutaria os linfócitos da bursa para o

intestino. Caso as alterações tivessem ocorrido sobre a maturação da bursa, o reflexo deste efeito se faria sobre a especificidade da resposta humoral.

A integração das idéias sobre o peso relativo com a análise microscópica feita da bursa sugere, ainda, que os presentes achados não foram capazes de determinar *per se* os efeitos produzidos pelo estresse; de fato não avaliamos o peso seco dos órgãos, e desta forma não temos como eliminar uma possível diferença de volume celular atribuída ao volume hídrico do órgão. Estas medidas seriam relevantes para demonstrar a existência de uma diferença na celularidade do órgão.

Ao analisar o peso do baço não encontramos diferenças significantes. Porém, observamos maior heterogeneidade no peso relativo do baço das aves dos grupos infectados, fato este possivelmente associado à responsividade do sistema imune frente ao desafio por um patógeno antigenicamente complexo. Mesmo considerando-se as discretas diminuições das medianas dos pesos relativos do baço nos grupos C/HS35 e I/HS35 em relação aos seus respectivos controles não estressados (C e I), não é possível fazer qualquer tipo de assertiva quanto aos efeitos do estresse por calor sobre o peso relativo do baço. Ressalta-se, no entanto, que visualizamos um discreto aumento da poupa vermelha nos cortes histológicos dos baços das aves do grupo infectado estressado (I/HS35), possivelmente associado a uma ação direta das toxinas produzidas pelo clostrídio nas células sanguíneas.

A complexa relação dos órgãos linfóides primários com os demais sistemas orgânicos, como por exemplo, o sistema nervoso e o próprio sistema imune, torna-os facilmente influenciáveis por alterações da homeostase. Suas estruturas complexas e as intrincadas relações que têm com respostas imunes inata e adaptativa demandam por técnicas laboratoriais mais acuradas para avaliação dos reais efeitos do estresse por calor sobre estes órgãos.

A participação do sistema gastrointestinal na manutenção da homeostase dos animais é o foco central de estudo deste trabalho. As mais evidentes alterações observadas neste trabalho foram relacionadas a este sistema, muito provavelmente em decorrência das características do desafio a que os animais foram submetidos. As principais alterações gastrintestinais encontradas foram observadas nos animais dos grupos tioglicolato (T), tioglicolato estressados (T/HS35), infectados (I) e infectados estressados (I/HS35). Nos animais que receberam o tioglicolato (T e

T/HS35) observou-se ao exame macroscópico uma coloração avermelhada da mucosa, principalmente do duodeno. Por ser uma substância com potencial inflamatório, a simples presença do tioglicolato na luz intestinal provoca a migração de células polimorfonucleares para o intestino fato que, por sua vez, libera mediadores inflamatórios. Alguns destes fatores, como a histamina, são vasodilatadores e facilitam o edema e a migração dos leucócitos para as regiões inflamatórias; assim, o aumento da circulação acarretaria a coloração avermelhada da mucosa dos animais dos grupos T e T/HS35 (SEGAL et al., 2002). Com o processo inflamatório em andamento (rubor) e os mediadores sendo liberados explica-se a descamação, a congestão e os focos de necrose no intestino, fatos estes que contribuíram para o aumento da dimensão das células caliciformes, por serem estas produtoras de muco, importante componente da barreira física contra o antígeno em questão (tioglicolato).

As alterações macroscópicas observadas nos animais do grupo T e T/HS35 foram semelhantes e tendiam à normalidade. Salienta-se, no entanto, que foram observadas lesões mais “brandas” no duodeno e no jejuno dos animais do grupo T/HS35 em relação aos do grupo T. Estas diferenças se mantiveram quando do exame microscópico, tornando-se mais evidentes (com diminuição acentuada de polimorfonucleares, principalmente heterofilos, nos vilos e na lâmina própria intestinal) nos animais estressados em relação aos animais não estressados. Quer nos parecer que, a diminuição do processo inflamatório desencadeado pelo tioglicolato esteja relacionada à menor quantidade de heterofilos presentes no intestino dos animais estressados, fato esse caracterizado também pela diminuição da descamação do epitélio das regiões de necrose e fusionamento de vilos. Não encontramos diferenças nas populações de linfócitos no intestino dos animais do grupo T em relação aos do grupo T/HS35. Esta ausência de diferenças, no entanto, não descarta a influência do estresse sobre este tipo celular no intestino. De fato, o estresse por calor pode ter modulado a resposta dos linfócitos intestinais, visto que observamos diferenças de heterofilos na mucosa intestinal, fato possivelmente, mediado por citocinas liberadas por linfócitos.

A análise macroscópica do intestino dos animais infectados revelou lesões com intensidade variando de brandas a moderadas e com características peculiares às de uma infecção por *C. perfringens*. Curiosa e inesperadamente, as

lesões encontradas, consequência do efeito tóxico das proteínas liberadas pelas bactérias em sinergia com o efeito inflamatório desencadeado pelo tioglicolato e pelas mesmas, foram produzidas de forma mais branda nos grupos estressados em relação aos animais não estressados.

A diminuição dos escores de lesão macroscópica nas aves dos grupos estressados em relação àqueles não estressados é reforçada pela concordância dos escores obtidos com dados provenientes das análises microscópicas. De fato, observou-se diminuição das lesões microscópicas nos animais estressados fato que foi acompanhado por maior produção de muco neutro e ácido, visualizado nas colorações histoquímicas especiais. Mais especificamente, focos de colonização bacteriana nos vilos foram mais brandos nos animais estressados sendo a resposta inflamatória menos intensa e caracterizada, principalmente, por diminuição de heterofilos na mucosa intestinal. Mais que isso, observou-se que o fusionalmento focal das vilosidades nos animais estressados (I/HS35) contrastou com as regiões de fusionalmento difuso encontradas no duodeno das aves do grupo não estressado (I), fato, acompanhado nestas aves não estressadas, por infiltrado linfoplasmocitário. Por mais que fosse evidente a diminuição de regiões com infiltrados linfoplasmocitários nos animais estressados, quando do exame imunoistoquímico não se demonstrou existência de diferenças na distribuição de linfócitos B e de plasmócitos nos infiltrados linfoplasmocitários.

Os escores microscópicos da lesão atribuídos às aves dos grupos T e T/HS35 foram de pouca importância em virtude das escassas diferenças observados entre eles e, também, pelas semelhanças dos valores encontrados (máximos: +1). As alterações morfológicas ocorreram de acordo com o esperado, sobretudo pelas características proinflamatórias do caldo tioglicolato. Em virtude da característica morfológica dos vilos maiores e abundantes no duodeno de aves, foi possível discernir com maior precisão as diferenças entre os grupos. Sendo assim, as diferenças de escores de lesão desencadeadas pelo estresse foram mais discretas ou ausentes no jejuno e no íleo dos animais dos grupos T e T/HS35, talvez por maior resistência do epitélio à lesão.

Chamou a atenção quando do exame microscópico intestinal dos animais estressados em relação aos não estressados a menor distribuição de heterofilos na mucosa intestinal das aves estressadas. Este achado estava possivelmente

relacionado a um efeito neuroimune. Quando se pensa em estresse, a primeira via de ativação a ser discutida é o eixo HHA. De fato, no caso das aves, a corticosterona é, à primeira vista, o principal hormônio indicativo do estresse (SODERHOLM, 2001) e diversos trabalhos têm utilizado a corticosterona para explicar seus efeitos na modulação do sistema imune (WEINSTOCK et al., 1998; POST, 2003). Porém se o estresse assim atua, quer nos parecer que sua participação na resposta à diminuição dos heterófilos tenha sido pouco relevante. De fato, nossos achados mostraram nas aves dos grupos T/HS35 e I/HS35 uma menor distribuição de heterófilos no intestino e, ao mesmo tempo, concentrações de corticosterona semelhantes às medidas dos animais controles. Estes fatos contrastam com a vasta distribuição de heterófilos e com a alta concentração sérica de corticosterona nos grupos T e I.

Um dos principais achados do exame histopatológico do intestino das aves foi a associação observada entre a baixa distribuição de heterófilos com oscores indicativos de lesão intestinal nos animais estressados em relação aos não estressados. Possivelmente, os heterófilos sejam responsáveis por grande parte das lesões teciduais observadas nos animais não estressados. Mostrou-se existência desta capacidade lesiva dos neutrófilos em mamíferos, tendo sido ela ligada a doenças autoimunes intestinais (GAYLE; BLIKSLAGER; JONES, 2000). No caso de nosso experimento, poder-se-ia dizer que o processo inflamatório estaria sendo mais prejudicial à manutenção da integridade intestinal das aves do que a ação *per se* da bactéria e/ou de sua toxina e, até mesmo, dos efeitos do caldo tioglicolato na mucosa.

Quando analisados os níveis séricos de corticosterona nas aves dos diferentes grupos, observamos aumento desses níveis nas aves do grupo controle submetidas ao estresse. Certamente, a via ativada relaciona-se ao eixo HHA (ZIEGLER, 2002); isto é, o estresse produzido pelo calor e pela enterite teriam estimulado o SNC das aves, a liberar CRF no núcleo paraventricular do hipotálamo que, por sua vez, estimularia a produção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na hipófise, fato que culminaria com a estimulação das adrenais e com o aumento agora encontrado nos níveis de corticosterona sérica (ZIEGLER, 2002).

Porém, e de forma interessante, observamos neste trabalho que os animais que receberam o tioglicolato ou que foram infectados e estressados apresentaram níveis mais baixos de corticosterona que aqueles dos grupos não estressados.

Parece-nos assim, possível sugerir que tenha ocorrido nas aves deste grupo estressado, uma ativação do eixo HHA em uma fase mais precoce do estresse que, em virtude de sua manutenção na vigência da enterite crônica, teria produzido uma estimulação prolongada do eixo HHA e, conseqüentemente teria ativado desse mecanismos de *feedback* negativo em relação à produção do CRF. Uma ativação de mecanismos de *feedback* explicaria os menores níveis de corticosterona encontrados nas aves dos grupos T/HS35 e I/HS35, isto é, próximos ao nível basal. Os baixos níveis de corticosterona observados nos animais estressados (T/HS35 e I/HS35) praticamente exclue a participação desta via na diminuição das células polimorfonucleares apresentados no intestino destas aves. Assim, uma alternativa viável para explicar a diminuição de heterófilos seria a ativação de outro sistema que impediria a migração e/ou a aderência das células inflamatórias no intestino delgado, seja por diminuir fatores de adesão celulares ou por liberar proteínas quimiotáticas, como as citocinas e quimiocinas. Esta diminuição poderia estar relacionada à ativação do SNAS.

Embora nossos resultados tenham mostrado diferenças evidentes de números de heterófilos na mucosa intestinal das aves dos diferentes grupos experimentais, o mesmo não ocorreu quanto aos linfócitos. Neste sentido, é evidente que linfócitos B participam de processos infecciosos dependentes de toxinas como, por exemplo, no caso clostridiose, ou de irritação das mucosas como é o caso do tioglicolato. Nessas situações, a imunidade humoral acaba sendo o principal mecanismo responsável por debelar o processo infeccioso, por opsonização bacteriana, bloqueio dos fatores de adesão bacterianos, ligação a sítios tóxicos nas proteínas secretadas pelas bactérias e opsonização das toxinas. A participação da imunidade humoral na ativação do processo inflamatório, ativação da via clássica do complemento ou ativação direta de receptores de linfócitos e macrófagos é considerada de extrema importância. Em se tratando da imunidade humoral, a primeira imunoglobulina sérica no reconhecimento dos antígenos é a IgM. Sabe-se ser a primeira resposta a um patógeno, o aumento da produção de IgM; sabe-se também que, 72 h após, ela é substituída em suas ações por um outro subtipo de imunoglobulina, a IgY, que tem maior avidéz e afinidade pelos sítios antigênicos (FLEISCHER, 1981). O papel da IgA está mais ligado à imunidade de mucosa,

sendo por isso mesmo de extrema importância em nosso estudo, por ser ela um dos principais fatores ligados ao sistema imune intestinal.

Torna-se relevante neste momento, comentar a presença de monômeros de IgA circulantes e a liberação de monômeros de IgA por plasmócitos residentes da mucosa intestinal. Durante o transporte das imunoglobulinas das células até à luz intestinal, os monômeros de IgA são acoplados a uma proteína (proteína J) formando dímeros, sendo liberadas destes na luz intestinal onde vão atuar (MESTECKY, 1999). Desta forma uma lesão epitelial pode comprometer a formação desses dímeros e/ou o acoplamento dos mesmos à IgA, por consequência, diminui a resposta imune local.

A quantificação dos níveis séricos de imunoglobulinas no presente estudo mostrou presença de maior concentração de IgM sérica nas aves dos grupos C/HS35 e I/HS35 em relação às dos grupos não estressados (C e T). Efeito inverso ocorreu nas aves do grupo T/HS35 em relação ao grupo T. O estresse por calor manteve a concentração sérica de IgY menor nas aves do grupo C/HS35 em relação às do grupo C e naquelas do grupo T/HS35 em relação às do grupo T. Observou-se também, discreta redução na concentração de IgA nas aves do grupo infectado estressado em relação às do grupo não estressado. Nas aves dos grupos C/HS35 e I/HS35 o estresse por calor produziu menores concentrações séricas de IgA. De forma inesperada, observamos que as concentrações de IgA séricas nas aves dos grupos tioglicolato foram homogêneas, e inferiores aos valores normais em ambos os grupos (T e T/HS35) em relação às dos demais grupos.

De forma geral pode-se dizer que, o estresse por calor diminuiu os níveis séricos de IgY e IgA, tendo efeito inverso naqueles de IgM. Diferente do que alguns trabalhos sugerem, o estresse por calor não reduziu neste trabalho as concentrações de todas as imunoglobulinas; desta forma, as menores concentrações observadas não indicariam, necessariamente, imunossupressão, ao menos no que diz respeito à resposta funcional do sistema imune ao patógeno. As baixas concentrações de IgA séricas observadas poderiam estar relacionada ao tipo de resposta imune que o tioglicolato desencadeou nos animais.

Outros achados importantes que podem reforçar a discussão sobre a imunossupressão/imunomodulação são as concentrações encontradas de IgA no lavado intestinal das aves. Nossos achados mostraram uma menor concentração de

IgA no lavado intestinal do jejuno das aves dos grupos C/HS35 e T/HS35 e menores concentrações de IgA no lavado do duodeno de todos os grupos estressados (C/HS35, T/HS35 e I/HS35) em relação aos dos animais não estressados (C, T e I).

Somados estes fatos aos já apresentados anteriormente quer nos parecer seja possível, sugerir um potencial modulador do estresse por calor sobre a concentração de IgA na luz inestinal. Mesmo assim, as diferenças agora relatadas podem não estar relacionadas diretamente ao estresse. A diminuição das lesões pode ter contribuído para uma menor colonização bacteriana e, desta forma, para um menor processo inflamatório diminuindo a exposição aos antígenos; de fato, sabe-se que uma menor colonização bacteriana leva a uma menor liberação de mediadores inflamatórios, fatos que resultam em menor demanda orgânica para os processos ligados à manutenção da integridade do epitélio intestinal e diminuição da migração de heterófilos. Desta forma, a menor concentração de IgA na luz intestinal poderia estar relacionada à diminuição dos fatores ativadores dos linfócitos B e à estimulação dos plasmócitos. Estes reflexos poderiam ser semelhantes aos observados neste experimento na circulação sistêmica.

A maior concentração de IgM sérica observada nos animais estressados poderia estar relacionada a um atraso na maturação dos órgãos linfóides primários estas aves. Estas aves, então, manteriam um padrão de resposta IgM inespecífica, por deficiência na apresentação de antígenos, fato que levaria a mudança do isotipo para IgY ou IgA. De qualquer forma, quer nos parecer que estes achados, tomados em conjunto com os demais já discutidos, apontam para uma atividade imunomodulatória, do estresse por calor sobre as vias inatas quanto nas adaptativas do sistema imune de aves.

Como já discutido, o estresse por calor preveniu as lesões provocadas pela infecção experimental isto é, diminuiu o processo inflamatório intestinal. Nesse sentido, grande parte dos achados histopatológicos observados nos animais não estressados estão associados ao efeito do sistema imune sobre o tecido (MALOY, 2011; SALIM, 2011; FOURNIER, 2012). Mais especificamente, na tentativa de debelar a infecção, o sistema imune provocaria mais lesões teciduais, em decorrência da liberação de radicais livres e proteínas que degradariam o tecido contribuindo, desta forma para o ao processo infeccioso. Desta forma, o melhor estado clínico observado nos animais estressados por calor poderia estar

relacionado à regulação do processo inflamatório intestinal induzido pelo estresse como, por exemplo, à diminuição das células polimorfonucleares intestinais, o que predisporia as aves a melhor debelar a infecção e a se recuperar das lesões provocadas pelas bactérias. Neste contexto, estes fatos não aconteceriam em animais não estressados.

Assim, faz nos parecer que o estresse por calor teria sido incapaz de predispor o organismo das aves ao desenvolvimento da enterite necrótica por ter sido estudado neste trabalho na vigência de uma infecção isolada pelo *C. perfringens*. Talvez esta seja a razão do emprego da co-infecção em tantos protocolos experimentais de NE. Assim sendo, como a doença a campo está associada geralmente a fatores predisponentes como coinfeções (AL-SHEIKHLY; AL-SAIEG, 1980; SHANE et al., 1985) e manejos inadequados (DAHIYA et al., 2006), é provável que a doença venha a termo de forma mais grave após o estresse por calor a nível de campo do que o agora apresentado em nosso experimento. De fato, já que a resposta imune, principalmente aquela ligada aos heterófilos, está diminuída no intestino, uma infecção por outras bactérias invasivas poderia ser facilitada; nesta nova condição, o sistema gastrintestinal das aves estaria mais susceptível ao desenvolvimento destas doenças, por diminuição da resposta fagocítica. Ou seja, quer nos parecer que não se possa extrapolar os presentes achados experimentais com *C. perfringens* para as condições de infecção a campo.

Neste contexto, sabe-se que a colonização inicial do TGI ocorre por bactérias anaeróbias facultativas sendo ele, posteriormente, colonizado por anaeróbios estritos. O microbioma vai se moldando com a idade, condições ambientais e alimentares. O condicionamento dos animais em isoladores restringe este tipo de crescimento, modulando a maturação do sistema imune gastrintestinal de forma diferencial daquela observada a campo. É importante caracterizar que os animais utilizados em nossos experimentos não foram manejados de forma tal a apresentar um microbioma que mimetizasse o real observado campo, isto é uma exposição variada a outros organismos. Esta característica reflete diretamente na colonização das aves por anaeróbios estritos. De fato, o cultivo microbiológico das fezes de regiões dos intestinos das aves em condições anaeróbias neste trabalho produziu o crescimento apenas da cepa utilizada na infecção e de outro tipo bacteriano anaeróbio. Em condições naturais, a variedade de anaeróbios ao se cultivar fezes

puras é grande, fator que contrasta com o achado deste trabalho experimental. Salienta-se ainda, a participação inquestionável da microbiota na maturação do sistema imune, o que termina por influenciar a eficiência da resposta imune.

Com base nos dados até então encontrados, parece-nos possível afirmar que o estresse por calor tenha sido capaz de prevenir o desenvolvimento de uma enterite necrótica aviária produzida por uma infecção isolada pelo *C. perfringens* em modelo experimental isento de co-infecção. Entretanto, inferimos que o estresse por calor possa predispor os animais mantidos em campo ao desenvolvimento de doenças de caráter invasivo pois haveria possibilidade da presença de coinfeções. Quer nos parecer seja possível sugerir que o estresse até mesmo possa contribuir para o aparecimento da enterite necrótica aviária a campo por diminuir a imunidade inata e humoral e, desta foram a resistência orgânica dos animais, predispondo-os, ao desenvolvimento de outras doenças predisponentes à NE. Sendo assim, fica evidente que a ativação do sistema nervoso pelo estresse por calor, e a consequente modulação do sistema neuroentérico, por alterações significativas na imunidade intestinal de aves. Desta forma, o presente estudo, ao reforçar a necessidade da manutenção da homeostase neuroimune com a microbiota em aves, acrescenta dados a outros já divulgados por nosso grupo de estudo nas áreas de neuroimunomodulação ou psiconeuroimunomodulação, em especial, em frangos de corte.

6 CONCLUSÕES

6.2 Conclusões Específicas

Concluimos que o estresse por calor de $35\pm1^{\circ}\text{C}$, aplicados de forma intermitente por 7 dias em frangos de corte desencadeou:

- Diminuição no ganho de peso corporal;
- Redução do peso relativo dos baço nas aves do grupo C/HS35;
- Aumento do peso relativo do baço nas aves do grupo T/HS35;
- Redução do peso relativo na Bursa de Fabrícus das aves;
- Redução do escore lesional intestinal macroscópico e microscópico;
- Redução da inflamação intestinal por diminuição da migração de polimorfonucleares para o intestino das aves;
- Aumento na concentração sérica de corticosterona nas aves do grupo C/HS35;
- Redução da concentração sérica de corticosterona nas aves dos grupos T/HS35 e I/HS35;
- Redução da concentração sérica de IgA nas aves do grupo I/HS35;
- Aumento na concentração sérica de IgM nas aves do grupo I/HS35;
- Redução da Concentração sérica de IgY nas aves;
- Redução da concentração de IgA no lavado do jejuno dos grupos C/HS35 e T/HS35;
- Aumento na concentração de IgA no lavado do duodeno no grupo I/HS35.

5.1 Conclusão Geral

Por tudo quanto exposto, concluímos que o estresse por calor possui caráter imunomodulador em aves, sendo ele, em grande parte, supressor da resposta imune intestinal humoral e celular. O envolvimento de uma via neuroimunológica nos achados experimentais torna-se praticamente irrefutável, embora as vias pelas quais ocorrem estas interrelações ainda não estejam totalmente compreendidas. Especificamente, o estresse por calor diminuiu as lesões intestinais desencadeadas pela infecção experimental ou ingestão do caldo tioglicolato, isto é, de alguma forma ele alterou o padrão de citocinas, quimiocinas e/ou as moléculas de adesão responsáveis pela migração de heterófilos para a mucosa intestinal o que, por sua vez, reduziu a inflamação intestestinal e consequentemente lesão tecidual tanto nos animais infectados, quanto nos animais que receberam o caldo tioglicolato sem a bactéria.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 564, 2011.
- ADER, R. On the development of psychoneuroimmunology. **European Journal of Pharmacology**, v. 405, n. 1-3, p. 167-76, 29 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.
- 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.
- ANDREASEN, C. B.; LATIMER, K. S.; HARMON, B. G.; GLISSON, J. R.; GOLDEN, J. M.; BROWN, J. Heterophil Function in Healthy Chickens and in Chickens with Experimentally Induced Staphylococcal Tenosynovitis. **Veterinary Pathology**, v. 28, n. 5, p. 419-427, 1991.
- 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.
- ASSIMAKOPOULOS, S. F.; PAPAGEORGIOU, I.; CHARONIS, A. Enterocytes' tight junctions: From molecules to diseases. **World Journal of Gastrointestinal pathophysiology**, v. 2, n. 6, p. 123-37, 2011.
- 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]. **Archives of Experimental Veterinary Medicine**, 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. 2580-7, 2003.

BARBARA, A. J.; TRINH, H. T.; GLOCK, R. D.; GLENN SONGER, J. Necrotic enteritis-producing strains of *Clostridium perfringens* displace non-necrotic enteritis strains from the gut of chicks. **Veterinary Microbiology**, v. 126, n. 4, p. 377-382, 25 2008.

BAUMS, C. G.; SCHOTTE, U.; AMTSBERG, G.; GOETHE, R. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. **Veterinary Microbiology**, v. 100, p. 11-16, 2004.

BEFUS, A. D.; JOHNSTON, N.; LESLIE, G. A.; BIENENSTOCK, J. Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny, and some functional characteristics of Peyer's patches. **Journal of immunology**, v. 125, n. 6, p. 2626-2632, 1980.

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.

BERNARD, C. **Principes de Médecine Expérimentale**. Paris, França: Les Presses universitaires de France, 1947.

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 Comparative Medicine**, v. 41, n. 1, p. 112-116, 1977.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. **Endocrinology Review**, 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.

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

BOYD, Y.; GOODCHILD, M.; MORROLL, S.; BUMSTEAD, N. Mapping of the chicken and mouse genes for toll-like receptor 2 (TLR2) to an evolutionarily conserved chromosomal segment. **Immunogenetics**, v. 52, n. 3-4, p. 294-298, 2001.

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.

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.

BRISBIN, J. T.; GONG, J.; SHARIF, S. Interactions between commensal bacteria and the gut-associated immune system of the chicken. **Anim Health Research Review**, v. 9, n. 1, p. 101-110, 2008.

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

BURNS, R. B. Histology and immunology of Peyer's patches in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Research in Veterinary Science**, v. 32, n. 3, p. 359-367, 1982.

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.

CHAKRABORTY, G. C.; CHAKRABORTY, D.; BHATTACHARYYA, D.; BHATTACHARYYA, S.; GOSWAMI, U. N.; BHATTACHARYYA, H. M. Necrotic enteritis in poultry in West Bengal. **Indian Journal of Comparative Microbiology Immunology and Infectious Disease**, v. 5, p. 54-57, 1984.

CHANDRATILLEKE, D.; HÅLA, 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.

CHAR, N. L.; KHAN, D. I.; RAO, M. R. K.; GOPAL, V.; NARAYANA, G. A rare occurrence of clostridial infections in poultry. **Poultry Adviser**, v. 19, n. 11, p. 59-62, 1986.

CHEN, P.; VAN HOVER, C.; 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. **Frontiers in Endocrinology**, v. 3, p. 180, 2012.

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.

COMMISSION, E.; OTHERS. Council Directive 2007/43/EC of 28 June 2007 laying down minimum rules for the protection of chickens kept for meat production. **Official Journal**, v. 182, n. 12, p. 7, 2007.

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.

COOPER, S. J. From Claude Bernard to Walter Cannon. Emergence of the concept of homeostasis. **Appetite**, v. 51, n. 3, p. 419-27, 2008.

CORDIER, A. Innervation of the bursa of Fabricius during embryogenesis and adult life . **L'innervation de la bourse de Fabricius durant l'embryogenèse et la vie adulte.**, v. 73, n. 1, p. 38-47, 1969.

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 Disiase**, v. 45, n. 4, p. 1050-1053, 2001.

CRESSMAN, M. D.; YU, Z.; NELSON, M. C.; MOELLER, S. J.; LILBURN, M. S.; ZERBY, H. N. Interrelations between the microbiotas in the litter and in the intestines of commercial broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 19, p. 6572-82, 2010.

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.

D'ESTE, L.; BIANCONE, S.; RENDA, T. Ontogenesis of 5-hydroxytryptamine-like immunoreactive cells and their relationship with bombesin in chicken proventriculus. **Basic and applied histochemistry**, v. 30, n. 1, p. 109-117, 1986.

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.

DALTON, J. E.; CRUICKSHANK, S. M.; EGAN, C. E.; MEARS, R.; NEWTON, D. J.; ANDREW, E. M.; LAWRENCE, B.; HOWELL, G.; ELSE, K. J.; GUBBELS, M.-J.; STRIEPEN, B.; SMITH, J. E.; WHITE, S. J.; CARDING, S. R. Intraepithelial $\gamma\delta$ lymphocytes maintain the integrity of intestinal epithelial tight junctions in response to infection. **Gastroenterology**, v. 131, n. 3, p. 818-829, 2006.

DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K. A.; KAISER, P. **Avian Immunology**. Londres: Elsevier. 2008. p. 481.

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. 342-4, 2004.

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. 3, p. 575-582, 2012.

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 New York Academy of Science**, v. 746, p. 33-37, 1994.

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.; MCEWEN, B. S. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. **Brain Behaviour Immunology**, 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.

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. G204-12, 2006.

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. 414-20, mar. 2004.

- DROUAL, R.; FARVER, T. B.; BICKFORD, A. A. Relationship of sex, age, and concurrent intestinal disease to necrotic enteritis in turkeys. **Avian Disease**, 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.
- 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.
- 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. 433-41, 1998.
- ENGSTROM, B. E.; FERMER, C.; LINDBERG, A.; SAARINEN, E.; BAVERUD, V.; GUNNARSSON, A. Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 225-235, 2003.
- EVANS, E. W.; BEACH, F. G.; MOORE, K. M.; JACKWOOD, M. W.; GLISSON, J. R.; HARMON, B. G. Antimicrobial activity of chicken and turkey heterophil peptides CHP1, CHP2, THP1, and THP3. **Veterinary Microbiology**, v. 47, n. 3-4, p. 295-303, 1995.
- EVANS, E. W.; BEACH, G. G.; WUNDERLICH, J.; HARMON, B. G. Isolation of antimicrobial peptides from avian heterophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 56, n. 5, p. 661-5, 1994.
- FAGARASAN, S. Intestinal IgA synthesis: a primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. **Current Topical in Microbiology and Immunology**, v. 308, p. 137-153, 2006.
- FARNELL, M. B.; HE, H.; GENOVESE, K.; KOGUT, M. H. Pharmacological analysis of signal transduction pathways required for oxidative burst in chicken heterophils stimulated by a Toll-like receptor 2 agonist. **International Immunopharmacology**, v. 3, n. 12, p. 1677-84, 2003.
- FECHIR, M.; SCHLERETH, T.; KRITZMANN, S.; BALON, S.; PFEIFER, N.; GEBER, C.; BREIMHORST, M.; EBERLE, T.; GAMER, M.; BIRKLEIN, F. Stress and thermoregulation: different sympathetic responses and different effects on experimental pain. **European journal of pain**, v. 13, n. 9, p. 935-41, 2009.
- FELDMAN, G. J.; MULLIN, J. M.; RYAN, M. P. Occludin: structure, function and regulation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 6, p. 883-917, 2005.
- FLEISCHER, B. The avian immune system. **Immunology Today**, v. 2, n. 10, p. 195-200, 1981.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Food Outlook Global Market Analysis**, 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org/gIEWS>>. Acessado em: 23 maio 2013.

FOURNIER, B. M.; PARKOS, C. A. The role of neutrophils during intestinal inflammation. **Nature**, v. 5, n. 4, p. 354-366, 2012.

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.

FOWLES, J. R.; FAIRBROTHER, A.; KERKVLIT, N. I.; FIX, M. Glucocorticoid effects upon mallard natural and humoral immunity. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 15, n. supplement, 1. 1991.

FRAME, D. D.; BICKFORD, A. A. An outbreak of coccidiosis and necrotic enteritis in 16-week-old cage-reared layer replacement pullets. **Avian Disease**, 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.

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

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 Physiology Regulatory and Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 1, p. R195-201, 2006.

GAYLE, J. M.; BLIKSLAGER, A. T.; JONES, S. L. Role of neutrophils in intestinal mucosal injury. **Free Radical Research**, v. 217, n. 6, p. 498-500, 2000.

GEFFNER, M. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on T- and B-lymphocytes and immune function. **Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992). Supplement**, 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.

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. 355-7, 1982.

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**, 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. 671-682, 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.

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.

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, 30 2004.

GRENHAM, S.; CLARKE, G.; CRYAN, J. F.; DINAN, T. G. Brain-gut-microbe communication in health and disease. **Front Physiol**, v. 2, n. 94, p. 15, 2011.

GULMEZ, N.; NAZLI, M.; ASLAN, S.; LIMAN, N. Immunolocalisation of serotonin, gastrin, somatostatin and glucagon in entero-endocrine cells of the goose (*Anser anser*). **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 51, n. 4, p. 439-49, 2003.

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.

HAMSCHER, G.; PAWELZICK, H. T.; SCZESNY, S.; NAU, H.; HARTUNG, J. Antibiotics in Dust Originating from a Pig-Fattening Farm : A New Source of Health Hazard for Farmers.. **Environmental Health Perspective**, v. 1590, n. 13, p. 1590-1594, 2003.

HART, A.; KAMM, M. A. Review article: mechanisms of initiation and perpetuation of gut inflammation by stress. **Aliment Pharmacologic Therapy**, v. 16, n. 12, p. 2017-2028, 2002.

HATHEWAY, C. L. Toxigenic clostridia. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 1, p. 66-98, jan. 1990.

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, 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.

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.

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.

HIGGS, R.; LYNN, D. J.; GAINES, S.; MCMAHON, J.; TIERNEY, J.; JAMES, T.; LLOYD, A. T.; MULCAHY, G.; O'FARRELLY, C. The synthetic form of a novel chicken beta-defensin identified in silico is predominantly active against intestinal pathogens. **Immunogenetics**, v. 57, n. 1-2, p. 90-98, 2005.

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.

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. 119-22, 1996.

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. **Brazilian Poultry Science**, v. 47, n. 4, p. 379-391, 2006.

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.

JEURISSEN, S. H. M.; VERVELDE, L.; JANSE, M. Structure and function of lymphoid tissues of the chicken. **Poultry Science Reviews**, v. 5, n. 3, p. 183-207, 1994.

JEURISSEN, S. H.; WAGENAAR, F.; JANSE, E. M. Further characterization of M cells in gut-associated lymphoid tissues of the chicken. **Poultry Science**, v. 78, n. 7, p. 965-72, 1999.

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. 1295-307, 2005.

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.

ELWINGE, K.; ENGSTROEM, B.; FOSSUM, O.; HASSAN, S.; TEGLOEF, B. Effect of coccidiostats on necrotic enteritis and performance in broiler chickens. **Swedish Journal of Agricultural Research**, v. 24, n. 1, p. 39-44, 1994.

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.

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.

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.

KELLER-WOOD, M. E.; DALLMAN, M. F. Corticosteroid Inhibition of ACTH Secretion. **Endocrine Reviews**, v. 5, n. 1, p. 1-24, 1984.

KEYBURN, A. L.; BOYCE, J. D.; VAZ, P.; BANNAM, T. L.; FORD, M. E.; PARKER, D.; DI RUBBO, A.; ROOD, J. I.; MOORE, R. J. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 2, p. e26, 2008.

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.

KOGUT, M. H.; CHIANG, H.-I.; SWAGGERTY, C. L.; PEVZNER, I. Y.; ZHOU, H. Gene Expression Analysis of Toll-Like Receptor Pathways in Heterophils from Genetic Chicken Lines that Differ in Their Susceptibility to *Salmonella enteritidis*. **Frontiers in Genetics**, v. 3, p. 121, 2012.

KOGUT, M. H.; MCGRUDER, E. D.; HARGIS, B. M.; CORRIER, D. E.; DELOACH, J. R. In vivo activation of heterophil function in chickens following injection with *Salmonella enteritidis*-immune lymphokines. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 57, n. 1, p. 56-62, 1995.

KULKARNI, R. R.; PARREIRA, V. R.; SHARIF, S.; PRESCOTT, J. F. Immunization of Broiler Chickens against *Clostridium perfringens*-Induced Necrotic Enteritis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 9, p. 1070-1077, 2007.

LAHAR, N.; LEI, N. Y.; WANG, J.; JABAJI, Z.; TUNG, S. C.; JOSHI, V.; LEWIS, M.; STELZNER, M.; MARTÍN, M. G.; DUNN, J. C. Y. Intestinal subepithelial

myofibroblasts support in vitro and in vivo growth of human small intestinal epithelium. **PloS one**, v. 6, n. 11, p. e26898, 2011.

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. 1750-1761, 2002.

LEPP, D.; GONG, J.; SONGER, J. G.; BOERLIN, P.; PARREIRA, V. R.; PRESCOTT, J. F. Identification of accessory genome regions in poultry *Clostridium perfringens* isolates carrying the netB plasmid. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 6, p. 1152-1166, 2013.

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 Medicine Biology Research**, v. 33, n. 10, p. 1141-1148, 2000.

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 <edicine. Revue canadienne de médecine comparée**, 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 Medicin**, 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.

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.

MALLOY, K. J.; POWRIE, F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. **Nature**, v. 474, p. 298-306, 2011.

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 of Experimental Biology 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 of Experimental Biology 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.; 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.

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.

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. An overview of Clostridium perfringens enterotoxin. **Toxicon**, v. 34, n. 11-12, p. 1335-1343, 1996.

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 - Comparative 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.

MESTECKY, J.; RUSSELL, M. W.; ELSON, C. O. Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface. **Gut**, v. 44, n. 1, p. 2-5, 1999.

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.

MINAYO, M. C. DE S. Saúde-doença: uma concepção popular da etiologia. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 4, n. 4, p. 363-381, 1988.

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.

MONTALI, R. J. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). **Journal of comparative pathology**, v. 99, n. 1, p. 1-26, jul. 1988.

MOREIRA, M. S. **Psiconeuroimunologia**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2003. p. 1-8.

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 Behaviour 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. **Journal of Experimental Medicine**, v. 146, n. 6, p. 1648-1662, 1977.

NERREN, J. R.; HE, H.; GENOVESE, K.; KOGUT, M. H. Expression of the avian-specific toll-like receptor 15 in chicken heterophils is mediated by gram-negative and gram-positive bacteria, but not TLR agonists. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 136, n. 1-2, p. 151-156, 2010.

NERREN, J. R.; KOGUT, M. H. The selective Dectin-1 agonist, curdlan, induces an oxidative burst response in chicken heterophils and peripheral blood mononuclear cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 127, n. 1-2, p. 162-166, 15 2009.

NICOTRA, L.; LORAM, L. C.; WATKINS, L. R.; HUTCHINSON, M. R. Toll-like receptors in chronic pain. **Experimental neurology**, v. 234, n. 2, p. 316-329, 2012.

OHMORI, Y.; OKADA, Y.; WATANABE, T. Immunohistochemical localization of serotonin, galanin, cholecystokinin, and methionine-enkephalin in adrenal medullary cells of the chicken. **Tissue & Cell**, v. 29, n. 2, p. 199-205, 1997.

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. 7, p. 845-853, 2012.

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.

PALMER, C.; BIK, E. M.; DIGIULIO, D. B.; RELMAN, D. A.; BROWN, P. O. Development of the human infant intestinal microbiota. **PLoS biology**, v. 5, n. 7, p. e177, 2007.

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, 1961.

PARISH, W. E. Necrotic enteritis in the fowl. II. Examination of the causal *Clostridium welchii*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 71, p. 394-404, 1961.

PARISH, W. E. Necrotic enteritis in the fowl. III. The experimental disease. **Journal of Comparative Pathology**, v. 71, p. 405-413, 1961.

PENNIALL, R.; SPITZNAGEL, J. K. Chicken neutrophils: oxidative metabolism in phagocytic cells devoid of myeloperoxidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 72, n. 12, p. 5012-5015, 1975.

PEREIRA, J. C. R. **Bioestatística em outras palavras**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2010, p. 424.

PETIT, L.; GIBERT, M.; POPOFF, M. R. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. **Trends Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 104-110, 1999.

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.

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.

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.; 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. 6 p. 1986-94, 2012.

UBA. Relatório Anual da União Brasileira de Avicultura. Disponível em: <http://www.abef.com.br/ubabef/publicacoes_relatoriosanuais.php>. Acessado em: 23/05/2013

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 Disease**, v. 36, n. 3, p. 499-503, 1992.

- RISOLD, P. Y.; SWANSON, L. W. Structural Evidence for Functional Domains in the Rat Hippocampus. **Science**, v. 272, n. 5267, p. 1484-1486, 1996.
- 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. 123-43, 1993.
- ROMPPANEN, T. Postembryonic development of the chicken bursa of Fabricius: a light microscopic histoquantitative study. **Poultry Science**, v. 61, n. 11, p. 2261-2270, nov. 1982.
- ROOD, J. I. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. **Annual Review Microbiology**, v. 52, p. 333-360, 1998.
- ROZENBOIM, I.; TAKO, E.; GAL-GARBER, O.; PROUDMAN, J. A.; UNI, Z. The effect of heat stress on ovarian function of laying hens. **Poult Science**, v. 86, n. 8, p. 1760-1765, 2007.
- SALIM, S.; SODERHOLM, J. D. Importance of Disrupted Intestinal Barrier in Inflammatory Bowel Diseases. **Inflammatory Bowel Disease**, v. 17, p. 362-381, 2011.
- SALVI, E.; RENDA, T. Immunohistochemical studies on the ontogenesis of some endocrine cells in the chicken antrum and duodenum. **Basic and Applied Histochemistry**, v. 30, n. 3, p. 307-316, 1986.
- SCHIEHMANN, D. A. Laboratory confirmation of an outbreak of *Clostridium perfringens* food poisoning. **Health Laboratory Science**, v. 14, n. 1, p. 35-38, 1977.
- SEGAL, B. H.; KUHNS, D. B.; DING, L.; GALLIN, J. I.; HOLLAND, S. M. Thioglycollate peritonitis in mice lacking C5, 5-lipoxygenase, or p47 phox: complement, leukotrienes, and reactive oxidants in acute inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 71, n. 3, p. 410-416, 2002.
- SELYE, H. A Syndrome Produced by Diverse Nocuous Agents. **Nature**, v. 138, p. 32, 1936.
- SELYE, H. Stress and disease. **Science**, v. 122, p. 625-631, 1955.
- SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. **J Neuropsychiatry Clinical Neuroscience**, v. 10, n. 2, p. 230-231, 1998.
- SHANE, S. M.; GYIMAH, J. E.; HARRINGTON, K. S.; SNIDER 3RD, T. G. Etiology and pathogenesis of necrotic enteritis. **Veterinary Research Community**, v. 9, n. 4, p. 269-287, 1985.
- 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.; 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, 2009.
- 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 Physiology Biology of Biochemistry Molecular Biology, v. 149, n. 2, p. 324-333, 2008.

SINGH, K. M.; SHAH, T.; DESHPANDE, S.; JAKHESARA, S. J.; KORINGA, P. G.; RANK, D. N.; JOSHI, C. G. High throughput 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. 10595-602, 2012.

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.

SMITH, A. L.; BEAL, R. The avian enteric immune system in health and disease. In: DAVISON KASPERS, B.; SCHAT, K. A. F. (Ed.). **Avian immunology**. London: Academic Press, 2008. p. 243-271.

SODERHOLM, J. D.; PERDUE, M. H. Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function. **American Journal Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 280, n. 1, p. G7-G13, 2001.

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. 1435-40, 2011.

SOLOMON, G. F.; MOOS, R. H. Emotions, Immunity, And Disease: A Speculative Theoretical Integration. **Archives of General Psychiatry**, v. 11, n. 6, p. 657, 1964.

SOLOMON, G. F.; AMKRAUT, A. A. Psychoneuroendocrinological effects on the immune response. **Annual Review of Microbiology**, v. 35, p. 155-184, 1981.

STALKER, M. J.; HAYES, M. A.; MAXIE, M. G. **Jubb, Kennedy & Palmer's pathology of domestic animals**. Edinburgh: Sauders Elsevier, 2007. p 1-296.

SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 926 p.

SZAFARCZYK, A.; MALAVAL, F.; LAURENT, A.; GIBAUD, R.; ASSENMACHER, I. Further Evidence for a Central Stimulatory Action of Catecholamines on Adrenocorticotropin Release in the Rat. **Endocrinology**, v. 121, n. 3, p. 883-892, 1987.

TERRÓN, M. P.; PAREDES, S. D.; BARRIGA, C.; ORTEGA, E.; RODRÍGUEZ, A. B. Comparative study of the heterophil phagocytic function in young and old ring doves (*Streptopelia risoria*) and its relationship with melatonin levels. **Journal of Comparative Physiology**. v. 174, n. 5, p. 421-427, 2004.

TRAVERSO-YÉPEZ, M.; MEDEIROS, L. F. de. Tremendo diante da vida: um estudo de caso sobre a doença dos nervos. **Interações**, v. 9, n. 18, p. 87-108, 2004.

TRINCHIERI, G.; SHER, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 3, p. 179-190, 2007.

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. **Brazilian Poultry Science**, v. 36, n. 5, p. 813-820, 1995.

TROWELL, J. E.; BREWER, D. B. Degranulation of chicken heterophil leucocytes during phagocytosis, studied by phase contrast and interference microscopy. **Journal of Pathology**, v. 120, n. 3, p. 129-144, 1976.

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. **J. Chinese Society of Veterinary Science**, v. 7, p. 13-17, 1981.

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. 1083-94, 1998.

VAN DIEST, S. A.; STANISOR, O. I.; BOECKXSTAENS, G. E.; DE JONGE, W. J.; VAN DEN WIJNGAARD, R. M. Relevance of mast cell-nerve interactions in intestinal nociception. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1822, n. 1, p. 74-84, 2012.

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.

WEINSTOCK, M.; POLTYREV, T.; SCHORER-APELBAUM, D.; MEN, D.; MCCARTY, R. Effect of prenatal stress on plasma corticosterone and catecholamines in response to footshock in rats. **Physiology Behavioral**, v. 64, n. 4, p. 439-444, 1998.

WHITNALL, M. H. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. **Progress in Neurobiology**, v. 40, n. 5, p. 573-629, 1993.

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, maio. 2003.

WITTE, W. Medical Consequences of Antibiotic Use in Agriculture. **Science**, v. 279, n. 5353, p. 996-997, 1998.

YAMAUCHI, K.; KAMISOYAMA, H.; ISSHIKI, Y. Effects of fasting and refeeding on structures of the intestinal villi and epithelial cells in White Leghorn hens. **Brazilian Poultry Science**, v. 37, n. 5, p. 909-921, 1996.

YOUNG, E. A.; AKANA, S.; DALLMAN, M. F. Decreased sensitivity to glucocorticoid fast feedback in chronically stressed rats. **Neuroendocrinology**, v. 51, n. 5, p. 536-42, maio. 1990.

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, C.; NGUYEN, T.; LIU, L.; SACCO, R. E.; BROGDEN, K. A.; LEHRER, R. I. Gallinacin-3, an inducible epithelial beta-defensin in the chicken. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 4, p. 2684-91, 1 abr. 2001.

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.