

BRUNO TAKASHI BUENO HONDA

Avaliação dos efeitos do estresse por calor sobre a atividade de
linfócitos e a resposta vacinal ao paramixovírus (Doença de
Newcastle) em frangos de corte

São Paulo
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

BRUNO TAKASHI BUENO HONDA

**Avaliação dos efeitos do estresse por calor sobre a atividade de
linfócitos e a resposta vacinal ao paramixovírus (Doença de
Newcastle) em frangos de corte**

São Paulo
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

BRUNO TAKASHI BUENO HONDA

**Avaliação dos efeitos do estresse por calor sobre a atividade de
linfócitos e a resposta vacinal ao paramixovírus (Doença de
Newcastle) 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.2833
FMVZ

Honda, Bruno Takashi Bueno

Avaliação dos efeitos do estresse por calor sobre a atividade de linfócitos e a resposta vacinal ao paramixovírus (Doença de Newcastle) em frangos de corte / Bruno Takashi Bueno Honda. -- 2013.
98 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. Estresse por calor. 2. Doença de Newcastle. 3. Linfócitos. 4. Corticosterona. I. Título.



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 por calor sobre a atividade de linfócitos e a resposta vacinal ao paramixovírus (Doença de Newcastle) em frangos de corte", protocolado sob o nº 2360/2011, utilizando 96 (noventa e seis) frangos, sob a responsabilidade do(a) 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 de 17/8/2011.

We certify that the Research "Evaluation of heat stress on the activity lymphocytes and vaccine response to paramyxovirus (Newcastle disease) in broiler chicken", protocol number 2360/2011, utilizing 96 (ninety-six) 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 in the meeting of day 8/17/2011.

São Paulo, 6 de outubro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: HONDA, Bruno Takashi Bueno

Título: Avaliação dos efeitos do estresse por calor sobre a atividade de linfócitos e a resposta vacinal ao paramixovírus (Doença de Newcastle) 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: _____

Ao Prof. Dr. João Palermo Neto

***Um exemplo de veterinário, por ter alcançado tamanha credibilidade e respeito
como profissional.***

***Pelos ensinamentos e orientações há 4 anos, desde a Iniciação Científica até o
Mestrado, que me guiaram no caminho profissional e permitiram alcançar
meus objetivos e chegar aonde estou hoje.***

Muito obrigado!

***Ao grande amigo Atilio Calefi,
Pela amizade e apoio. Muito obrigado!***

Aos profissionais:

***Cesar Azevedo Lopes, por sempre acreditar e me apoiar em inúmeros
momentos.***

&

***Christopher Roger White, que me contratou acreditando e confiando na minha
capacidade em enfrentar esse enorme desafio de trabalhar e finalizar um
mestrado. Pelo respeito e confiança.***

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Patologia Animal, pelas estruturas e formação;

À Phibro Saúde Animal Internacional Ltda, por me contratar mesmo já tendo iniciado o mestrado, confiando na minha capacidade como profissional;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Projeto Temático - nº 2009/51886-3) e ao CNPq (Projeto Universal - nº 470776/2009-9) pelo suporte financeiro do nosso grupo de pesquisa;

Ao Prof. Dr. Antonio Piantino Ferreira, por auxiliar e ceder as instalações para a realização dos experimentos;

À Clea Camargo, pela amizade e conselhos;

À minha irmã, Brunela Honda, que sinto grande felicidade em tê-la ao meu lado, me apoiando;

Ao Bruno Porfirio, por ser meu companheiro e estar ao meu lado há 4 anos, ajudando a enfrentar todos os momentos, sejam eles fáceis ou difíceis;

À minha mãe, Ana Honda, por me criado e feito eu me tornar o que sou hoje, junto ao meu pai, Takashi Honda;

Às minhas melhores amigas Dandara Murad e Carolina Recalde, por estarem ao meu lado por tanto tempo;

À Juliana Shimizu, ex-companheira de trabalho na Phibro e amiga, pela amizade e apoio nas mais diversas situações;

À Dra. Viviane Ferraz de Paula, pelo apoio desde a iniciação científica até o final do mestrado;

Aos amigos Atilio Calefi, Carolina Costola, Lilian Namazu, Wanderley Quinteiro-Filho, Thiago Aloia, Vinícius Izídio, Juliana Fonseca, Alison Ribeiro, Adriana Tiemi e Milene Lobão;

Aos técnicos do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do departamento: Vagner, Herculano e Nicolle, pelo auxílio nos experimentos e na obtenção dos materiais necessários;

Por fim, a todos os componentes do grupo de neuroimunomodulação e a todos que me auxiliaram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

HONDA, B. T. B. **Avaliação dos efeitos do estresse por calor sobre a atividade de linfócitos e a resposta vacinal ao paramixovírus (Doença de Newcastle) em frangos de corte.** [Effects of heat stress on lymphocytes activity and vaccine response to paramyxovirus (Newcastle Disease) in broiler chicken]. 2013. 98f. Dissertação (em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Uma série de fatores como ambiente, nutrição e doenças podem ser consideradas como estressores em sistemas de produção. Frangos de corte expostos a estressores por períodos prolongados de tempo apresentam de forma geral, redução do ganho de peso e consumo de ração, aumento da conversão alimentar, aumento da média de mortalidade e predisposição a doenças. A vacinação é uma prática essencial para um adequado manejo da produção e o desenvolvimento da imunidade do frango de corte frente a desafios bacterianos e virais presentes no ambiente. O entendimento dos fatores que podem interferir com o sucesso da vacinação é essencial para a otimização da saúde e do bem-estar animal, permitindo a utilização de todo o seu potencial genético e nutricional. Poucos estudos têm enfatizado o efeito do estresse por calor na imunidade celular e humoral de frangos de corte. Este trabalho tem como objetivo estudar o efeito do estresse por calor sobre a imunidade celular (linfócitos B e T), humoral sérica (IgM e IgY) e o peso relativo de órgãos (baço, bursa e fígado) de frangos de corte submetidos a um protocolo de vacinação para a Doença de Newcastle (cepa LaSota). Para tanto, 96 frangos de corte Cobb machos foram aleatoriamente divididos em quatro grupos: grupo 1. Frangos de corte não vacinados expostos à temperatura termoneutra; grupo 2. Frangos de corte vacinados expostos à temperatura termoneutra; grupo 3. Frangos de corte não vacinados expostos ao protocolo de estresse térmico por calor ($38\pm 2^{\circ}\text{C}$); e grupo 4. Frangos de corte vacinados expostos ao protocolo de estresse térmico por calor ($38\pm 2^{\circ}\text{C}$). Todas as aves foram alojadas em isoladores com água e ração *ad libitum*. Foi utilizada uma vacina com o vírus atenuado para Doença de Newcastle (cepa LaSota) administrada em duas doses, aos 7 e aos 14 dias de vida. Os frangos submetidos ao protocolo de estresse foram expostos a uma temperatura de ($38\pm 2^{\circ}\text{C}$) do segundo até o sexto dia de vida. Os dados obtidos demonstraram

que o estresse por calor de forma isolada reduziu o peso relativo do fígado e aumenta aquela do baço e da bursa e induziu uma alteração significativa do perfil de células imunes no sangue periférico das aves, como consequência, observou-se alteração no padrão de imunoglobulinas, o que influenciou diretamente a resposta da ave frente ao desafio ambiental (quando o estresse foi avaliado isoladamente) ou vacinal (quando o estresse foi avaliado juntamente ao desafio vacinal com o vírus da Doença de Newcastle). Dessa forma, sugerimos que o estresse por calor diminuiu a eficácia da resposta vacinal aos frangos de corte, em função de mudanças que induziu no perfil de linfócitos e produção de imunoglobulinas.

Palavras-chave: Estresse por calor. Doença de Newcastle. Linfócitos. Corticosterona

ABSTRACT

HONDA, B. T. B. **Effects of heat stress on lymphocytes activity and vaccine response to paramyxovirus (Newcastle Disease) in broiler chicken.** [Avaliação dos efeitos do estresse por calor sobre a atividade de linfócitos e a resposta vacinal ao paramixovírus (Doença de Newcastle) em frangos de corte]. 2013. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A number of factors, such as environment, nutritional status and diseases are stressful for animals during livestock production. It has been shown that broilers exposed to stressors for prolonged periods tend to present decreased weight gain and feed intake and to have an increased feed conversion ratio, increase mortality rate and predisposition to diseases caused by secondary agents. Vaccination is an essential practice for adequate management of the livestock and protection of poultry against bacterial and viral infectious agents. Understanding the factors that modify the success vaccination is essential for optimizing animal health and welfare, thus allowing them to use of all the genetic and nutritional potential they have. Few studies have emphasized the effects of heat stress on cellular and humoral broilers immunity. This study aimed at discussing the effects of heat stress on cellular immunity (B and T lymphocytes) and humoral immunity (IgM and IgY) of broilers undergoing a vaccination protocol for Newcastle disease (LaSota strain). For this purpose, 96 male broilers (Cobb) were random divided into four groups: 1. Unvaccinated broiler chickens exposed to thermoneutral temperature; 2. Vaccinated broiler chickens exposed to thermoneutral temperature; 3. Unvaccinated broiler chickens exposed to a heat stress protocol ($38\pm 2^{\circ}\text{C}$). 4. Vaccinated broiler chickens exposed to a heat stress protocol ($38\pm 2^{\circ}\text{C}$). All broilers were housed in isolators and provided water ad lib. We used a live Newcastle vaccine disease virus of LaSota strain given in two doses at 7 and 14 days. The broiler chickens were exposed to heat stress ($38\pm 2^{\circ}\text{C}$) from the 2nd to 6th day of life. It has been observed that when combined with the vaccination challenge, heat stress was able to change immune cells profile from a B to T cytotoxic and T helper immune cells, keeping this change pattern until the end of the study period (over 19 days). This change in the cellular response pattern modified the ability of the broiler chickens' immune system to react

while challenged by vaccination, reducing its efficiency and making them more susceptible to the disease agent. The data obtained suggest that heat stress by itself induced considerable modifications in the liver, spleen and bursa de Fabricius and induced a significant modification in the profile of immune cells in peripheral blood of birds, with responsive modifications in the pattern of immunoglobulins, directly influencing the response of the broilers against the environmental challenge (when the stress is evaluated separately) or the vaccination (when the stress is measured along the challenge vaccination with Newcastle Disease virus). Therefore, we suggest that the heat stress was capable of reduce the efficacy of the vaccinal response in broiler chickens, related to the modification of the lymphocytes and the production of immunoglobulins.

Key-words: Heat Stress. Newcastle Disease. Lymphocytes. Corticosterone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Aves pertencentes ao grupo submetido ao estresse térmico (Figura A) e aves do grupo controle (Figura B).	42
Figura 2 –	Dot plot das populações de células (Complexidade X Bu1) e histograma da média de intensidade de fluorescência analisada (Bu) de células marcadas com anti-Bu1 (Linfócito B).....	45
Figura 3 –	Dot plot das populações de células (Complexidade X CD4) e histograma da média de intensidade de fluorescência analisada (CD4) de células marcadas com anti-CD4 (Linfócitos T CD4+).....	45
Figura 4 –	Dot plot das populações de células (Complexidade X CD8) e histograma da média de intensidade de fluorescência analisada (CD8) de células marcadas com anti-CD8 (Linfócitos T CD8+).....	46
Figura 5 –	Dot plot das populações de células (Complexidade X CD3) e histograma da média de intensidade das fluorescências analisadas (CD3 e CD4) de células marcadas com anti-CD3 (Linfócitos T totais) e anti-CD4 (Linfócitos T CD4+).	46
Figura 6 –	Esquema do delineamento Experimental dos grupos não vacinados C e E.	47
Figura 7 –	Esquema do delineamento Experimental dos grupos vacinados C/V e E/V.....	48
Figura 8 –	Efeito dos diferentes tratamentos sobre o peso relativo do fígado dos animais aos 7 dias de vida.....	50
Figura 9 –	Efeito dos diferentes tratamentos sobre o peso relativo do fígado dos animais aos 14 dias de vida.....	50
Figura 10 –	Efeito dos diferentes tratamentos sobre o peso relativo do fígado dos animais aos 19 dias de vida.....	51
Figura 11 –	Efeito dos diferentes tratamentos sobre o peso relativo da bursa dos animais aos 7 dias de vida.....	52
Figura 12 –	Efeito dos diferentes tratamentos sobre o peso relativo da bursa dos animais aos 14 dias de vida.....	53
Figura 13 –	Efeito dos diferentes tratamentos sobre o peso relativo da bursa dos animais aos 19 dias de vida.....	53

Figura 14 –	Efeito dos diferentes tratamentos sobre o peso relativo do baço dos animais aos 7 dias de vida.....	55
Figura 15 –	Efeito dos diferentes tratamentos sobre o peso relativo do baço dos animais aos 14 dias de vida.....	55
Figura 16 –	Efeito dos diferentes tratamentos sobre o peso relativo do baço dos animais aos 19 dias de vida.....	56
Figura 17 –	Efeito dos diferentes tratamentos sobre a concentração sérica de IgM no sangue periférico dos animais aos 7 dias de vida	57
Figura 18 –	Efeito dos diferentes tratamentos sobre a concentração sérica de IgM no sangue periférico dos animais aos 14 dias de vida	58
Figura 19 –	Efeito dos diferentes tratamentos sobre a concentração sérica de IgM no sangue periférico dos animais aos 19 dias de vida	58
Figura 20 –	Efeito dos diferentes tratamentos sobre a concentração sérica de IgY no sangue periférico dos animais aos 7 dias de vida.....	60
Figura 21 –	Efeito dos diferentes tratamentos sobre a concentração sérica de IgY no sangue periférico dos animais aos 14 dias de vida	60
Figura 22 –	Efeito dos diferentes tratamentos sobre a concentração sérica de IgY no sangue periférico dos animais aos 19 dias de vida.....	61
Figura 23 –	Efeito dos diferentes tratamentos sobre a concentração sérica de corticosterona dos animais aos 7 dias de vida	62
Figura 24 –	Efeito dos diferentes tratamentos sobre a concentração sérica de corticosterona dos animais aos 14 dias de vida	63
Figura 25 –	Efeito dos diferentes tratamentos sobre a concentração sérica de corticosterona dos animais aos 19 dias de vida	63
Figura 26 –	Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porcentagem de linfócitos B no sangue periférico dos animais aos 7 dias de vida.....	65
Figura 27 –	Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porcentagem de linfócitos B no sangue periférico dos animais aos 14 dias de vida.....	66
Figura 28 –	Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porcentagem de linfócitos B no sangue periférico dos animais aos 19 dias de vida.....	66
Figura 29 –	Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porcentagem de linfócitos T no sangue periférico dos animais aos 7 dias de vida.....	68

Figura 30 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porcentagem de linfócitos T no sangue periférico dos animais aos 14 dias de vida.....	68
Figura 31 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porcentagem de linfócitos T no sangue periférico dos animais aos 19 dias de vida.....	69
Figura 32 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porcentagem de linfócitos T auxiliares no sangue periférico dos animais aos 7 dias de vida	70
Figura 33 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porcentagem de linfócitos T auxiliares no sangue periférico dos animais aos 14 dias de vida	71
Figura 34 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porcentagem de linfócitos T auxiliares no sangue periférico dos animais aos 19 dias de vida	71
Figura 35 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porcentagem de linfócitos T citotóxicos no sangue periférico dos animais aos 7 dias de vida	73
Figura 36 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porcentagem de linfócitos T citotóxico no sangue periférico dos animais aos 14 dias de vida	73
Figura 37 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porcentagem de linfócitos T citotóxicos no sangue periférico dos animais aos 19 dias de vida	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre as médias dos pesos relativos do fígado dos animais	51
Tabela 2 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre as médias dos pesos relativos da bursa dos animais	54
Tabela 3 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre as médias dos pesos relativos do baço dos animais.	56
Tabela 4 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre as médias das concentrações séricas de IgM no sangue periférico dos animais.	59
Tabela 5 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre as médias das concentrações séricas de IgY no sangue periférico dos animais.	61
Tabela 6 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre a média de corticosterona sérica no sangue periférico dos animais.....	64
Tabela 7 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre a média de porcentagem de Linfócitos B no sangue periférico	67
Tabela 8 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre a média de porcentagem de Linfócitos T no sangue periférico.....	69
Tabela 9 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre a média de porcentagem de Linfócitos T auxiliares no sangue periférico.....	72
Tabela 10 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre a média de porcentagem de Linfócitos T citotóxicos no sangue periférico	74

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH –	Hormônio Adrenocorticotrópico
ANOVA –	Análise de variância de uma via
C –	Grupo controle
CRH –	Fator liberador de corticotrofina
C/V –	Grupo controle vacinado
DN –	Doença de newcastle
E –	Grupo estresse
EDTA –	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ELISA –	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMBRAPA –	Empresa brasileira de pesquisa agropecuária
E/V –	Grupo estresse vacinado
GC –	Glicocorticoide
HBSS –	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HHA –	Hipotálamo-hipófise-adrenal
H:L –	Proporção heterofilo/neutrófilo:linfócito
Ig –	Imunoglobulina
IL –	Interleucina
INF –	Interferon
iNOS –	Óxido nítrico sintetase
LPS –	Lipopolissacarídeo
NK –	<i>natural killers</i>
OIE –	Organização Internacional de Epizootias
PBS –	<i>Phosphate buffered saline</i>
pIgR -	Receptor polimérico de imunoglobulina

PNSA -	Plano Nacional de Sanidade Avícola
SI -	Sistema imune
SNA -	Sistema nervoso autónomo
SNC -	Sistema nervoso central
SNS -	Sistema nervoso simpático
Th -	Linfócitos T helper
TNF -	Fator de necrose tumoral
Treg -	Linfócitos T regulatórios
UBABEF -	União brasileira de avicultura
vDN -	Vírus da doença de newcastle

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	Revisão de Literatura.....	23
2.1	Neuroimunomodulação.....	23
2.2	Estresse, Imunidade e Vacinação em Frangos de Corte.....	31
3	OBJETIVOS.....	39
3.1	Objetivo geral.....	39
3.2	Objetivos específicos.....	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.2	Animais.....	40
4.3	Determinação dos grupos.....	40
4.4	Procedimentos.....	41
4.4.1	Estresse Térmico.....	41
4.4.2	Desafio com o Vírus da Doença de Newcastle (cepa La Sota).....	42
4.4.3	Pesagem dos órgãos / Determinação do Peso Relativo.....	42
4.4.4	Análise dos Níveis Séricos de IgM e IgY.....	43
4.4.5	Quantificação dos Níveis Séricos de Corticosterona.....	43
4.4.6	Separação de Leucócitos do Sangue Total (Percoll).....	43
4.4.7	Imunofenotipagem de Linfócitos B e T.....	44
4.4.8	Delineamento Experimental.....	47
4.4.9	Análise estatística.....	48
5	RESULTADOS.....	49
5.1	Avaliação do peso relativo de Baço, Bursa de Fabricius e Fígado.....	49
5.1.1	Peso Relativo do Fígado.....	49
5.1.2	Peso Relativo da Bursa de Fabricius.....	52

5.1.3	Peso Relativo do Baço	54
5.2	Quantificação dos Níveis Séricos de Imunoglobulinas	56
5.2.1	Quantificação Sérica de IgM	57
5.2.2	Quantificação Sérica de IgY	59
5.3	Quantificação dos Níveis Séricos de Corticosterona	62
5.4	Avaliação das Populações de Linfócitos B e T de Sangue Periférico	64
5.4.1	Linfócito B (anti-Bu1-PE)	64
5.4.2	Linfócitos T Totais (anti-CD3-FITC).....	67
5.4.3	Linfócitos T auxiliares (anti-CD4-PE).....	69
5.4.4	Linfócitos T citotóxicos (anti-CD8-PE).....	72
6	DISCUSSÃO.....	75
7	CONCLUSÕES.....	86
7.1	Conclusões Específicas	86
7.2	Conclusão Geral	86
	REFERÊNCIAS.....	87

1 INTRODUÇÃO

Segundo índices fornecidos pela União Brasileira de Avicultura – UBABEF (2012), entre os anos de 1960 e 2012, a produção avícola mundial quadruplicou. No Brasil, esse avanço alcançou valores de 11 milhões de toneladas em 2008, tornando-se nosso país o quarto maior produtor de carne de frango do mundo e o primeiro exportador mundial dessa *commoditie*. A produção no Brasil chegou a 13,058 milhões de toneladas em 2011, um crescimento de 6,8% em relação a 2010. Em maio de 2011, as exportações brasileiras de carne de frango geraram uma receita cambial de US\$742,6 milhões, valor que representou aumentos de 7,7% sobre o mês anterior e de 32% sobre maio de 2010. Os índices de produtividade saltaram de 8 milhões de toneladas em 1960 para 71,715 milhões de toneladas em 2009 (UBABEF, 2012).

A elevada taxa de crescimento da avicultura tem sido atribuída à modernização e à contínua busca por superação dos índices de desempenho zootécnico pelo setor. Observa-se uma constante necessidade de redução de custos e de aumento de produtividade. Neste cenário a avicultura se destaca por ser considerada um dos setores mais organizados do país, principalmente devido a seus resultados em produtividade, em volume de abate e desempenho econômico (EMBRAPA, 2003). Dados apresentados por Patrício (2011) mostraram que em 1930, frangos eram abatidos com 1,3kg, com conversão alimentar de 3,5 às 15 semanas de idade; já em 2009, o peso de abate aumentou para 2,4kg, a conversão alimentar para 1,76 e a idade de abate diminuiu consideravelmente podendo chegar hoje até mesmo a menos de 41 dias.

Com o relevante aumento na produção de aves de corte nas últimas décadas, foi necessária uma modificação das políticas de segurança alimentar e de meio ambiente relacionadas aos sistemas modernos de produção animal. Neste sentido, a União Europeia estabeleceu normas de bem-estar animal, o que contribuiu para a criação de “barreiras comerciais”. Devido a este fato, torna-se cada vez mais relevante considerar os efeitos induzidos por estímulos estressores, como calor, frio e superpopulação em animais de produção, não apenas devido às demandas da sociedade pela manutenção do bem-estar dos animais, mas também à necessidade de se obterem melhores resultados produtivos e sanitários,

diretamente ligados à rentabilidade do sistema. De fato, não apenas os países que comercializam o produto, mas também os consumidores em todo o mundo vêm se tornando cada vez mais exigentes na busca por alimentos de melhor qualidade, menores preços e respeito quanto à produção e aos padrões de bem estar animal (QUINTEIRO-FILHO et al., 2010).

Neste contexto, é importante ressaltar que uma série de fatores como ambiente e estado nutricional, fisiológico e social pode gerar estresse em animais de produção. De fato, frangos de corte submetidos a estressores ambientais como, por exemplo, o calor por um período prolongado de tempo, apresentam queda no desempenho zootécnico, redução do ganho de peso e aumento do consumo de ração, isto é, aumento da conversão alimentar e, também da taxa de mortalidade (QUINTEIRO-FILHO et al., 2010). Além disso, atualmente existem evidências em frangos de corte referentes ao estresse como agente ambiental capaz de suprimir seletiva e potencialmente a imunidade celular e humoral, com conseqüente falha no desenvolvimento da resposta de aves vacinadas e involução de órgãos do sistema imune como bursa, timo, baço e fígado (SHINI et al., 2008, 2010; SHINI; KAISER, 2009).

Pode-se afirmar que o sistema de produção de frangos de corte está sujeito à influência de agentes estressores que induzem imunossupressão que, por sua vez, aumentam a suscetibilidade do plantel a doenças infecciosas. Neste sentido, a compreensão da presença e da patogênese dos fatores de risco relacionados à imunossupressão é essencial para o sucesso na otimização da saúde e bem-estar das aves, permitindo assim, a elas que utilizem todo o potencial genético e nutricional que foi investido na criação (HOERR, 2010). O presente trabalho propõe-se dar continuidade à linha de pesquisa desenvolvida pelo Grupo de Neuroimunomodulação no Departamento de Patologia (VPT-FMVZ-USP), avaliando em frangos de corte, os efeitos do estresse por calor sobre a atividade de linfócitos e a resposta vacinal ao paramixovírus (Doença de Newcastle).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neuroimunomodulação

A Neuroimunomodulação ou Psiconeuroimunologia é conceitualmente definida como a área do conhecimento que estuda os mecanismos das interações neuro-imuno-endócrinas, ou seja, os mecanismos pelos quais os sistemas nervoso central (SNC) e imune (SI) promovem a troca de informações e o controle recíproco (ALVES, 2010). Muitos trabalhos têm buscado a compreensão das interações entre o comportamento, as funções neurais e endócrinas e os processos imunes, tendo-se sugerido, até mesmo, a existência de um sistema orgânico único e integrado em que cada uma dessas partes executa uma função especializada, na busca da manutenção da homeostase frente a desafios endógenos ou exógenos (ADER, 2000; ALVES; PALERMO-NETO, 2007; RIBEIRO et al., 2009).

A pesquisa no campo da neuroimunomodulação tem como marco inicial os trabalhos desenvolvidos por Hans Selye (1936), que mostraram os efeitos de diversos estímulos estressores, tais como, frio, injúria tecidual, excesso de exercícios e intoxicações, sobre o tamanho de órgãos linfoides como o timo, o baço e linfonodos em animais de laboratório. Achados de necropsia evidenciaram, também, a ocorrência de uma hipertrofia das glândulas adrenais, o aparecimento de úlceras gástricas e a atrofia de órgãos linfoides nos animais submetidos a estes estímulos estressores. Assim, propôs-se o conceito de “Síndrome de Adaptação Geral” posteriormente denominado de estresse (revisado por ALVES; PALERMO-NETO, 2007). No entanto, somente em 1977 foram relatadas as primeiras evidências realmente diretas das relações neuroimunes por Besedovsky e Sorkin (1977), que demonstraram ser a ativação do sistema imune capaz de aumentar a razão de disparos em neurônios hipotalâmicos, permitindo a identificação do envolvimento do cérebro no SI.

Nos últimos 30 anos, a autonomia funcional dos sistemas nervoso central (SNC) e imune (SI) tem sido desafiada. Observa-se uma regulação recíproca do SNC para o SI através de vias hormonais e nervosas, e do SI para o SNC através

de citocinas (WEBSTER; TONELLI; STERNBERG, 2002). Besedovsky e Sorkin (1977) também observaram alterações na atividade de neurônios hipotalâmicos após ativação do SI por lipopolissacarídeo (LPS), fato coincidente com o aumento nas concentrações séricas de hormônio adenocorticotrópico (ACTH) e corticosterona induzidas pela injeção de LPS. Estes dados em seu conjunto mostraram a existência de interações imuno-neuroendócrinas bidirecionais, onde o SNC é capaz de influenciar a formação da resposta imune e, em contrapartida, a ativação do SI é capaz de alterar a atividade do SNC. Inúmeros dados adicionais vêm consolidando a existência da interação entre esses dois sistemas (ELENKOV et al., 2000; ALVES; PALERMO-NETO, 2007; COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010). Dentre eles, pode-se citar a produção, bem como a existência de receptores para citocinas, neurotransmissores, hormônios e neuropeptídeos em células nervosas e imunes (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996).

Além disso, mais especificamente com relação à ação do SNC sobre o SI, podem ser citadas as duas principais vias: ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (eixo HHA), via hormonal referente à resposta neuroendócrina ao estresse; e Sistema Nervoso Autônomo (SNA), via neurotransmissores adrenérgicos.

Com relação ao eixo HHA, a comunicação se faz através de hormônios hipotalâmicos e pituitários, como hormônio liberador de corticotrofina (CRH), ACTH e glicocorticóides (GC) (PUVADOLPIROD; THAXTON, 2000; POST; REBEL; TER HUURNE, 2003; WRONA et al., 2005; MUMMA et al., 2006; SHINI et al., 2008, 2010; GROSS; SIEGEL, 2013; SOCIETY, 2013). Essas alterações hormonais foram observadas após inúmeros estímulos estressores, como por exemplo: estresse por choque nas patas (FONSECA; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2002), convivência com companheiro doente (ALVES et al., 2006; ALVES; PALERMO-NETO, 2007; PALERMO-NETO et al., 2008), restrição de movimento (CAO; HUDSON; LAWRENCE, 2003), e confrontos sociais (SÁ-ROCHA; PALERMO-NETO, 2006); ou estressores químicos, como anfetamina (LIGEIRO-OLIVEIRA et al., 2004), picrotoxina (STANKEVICIUS et al., 2008) e MDMA (FERRAZ-DE-PAULA et al., 2011).

Por outro lado, também se observa a comunicação entre os sistemas nervoso e imune através da ativação do SNA e liberação de noradrenalina (NA) pelo Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNS) e de adrenalina (AD) pela

medula adrenal (WEBSTER; TONELLI; STERNBERG, 2002; NANCE; SANDERS, 2007). De fato, tecidos linfoides primários e secundários são inervados por fibras simpáticas pós-ganglionares noradrenérgicas (MADDEN; SANDERS; FELTEN, 1995; WRONA et al., 2005) que mantém íntimo contato com células linfoides possibilitando assim, conexões com leucócitos que expressam adenoceptores em sua superfície, os alfa e beta-2-adrenoceptores. A liberação de catecolaminas pode aumentar (SCHEDLOWSKI et al., 1993; SELIGER et al., 2012) ou diminuir (CUNNICK et al., 1990; ALVES et al., 2006) a atividade de células do SI. Desta forma, a regulação neuroendócrina e autonômica do SI é essencial para a sobrevivência durante o estresse ou processo infeccioso e, para a modulação da resposta imune em doenças inflamatórias (WEBSTER; TONELLI; STERNBERG, 2002).

Neste sentido e em direção oposta, Berkenbosch et al. (1987) demonstraram que o SI era capaz de se comunicar e também de modular a atividade do SNC, uma vez que citocinas produzidas por células do SI influenciaram a função cerebral. Um exemplo deste feito foi a observação de que a administração de interleucina 1 (IL-1), uma citocina produzida predominantemente após a ativação de macrófagos e monócitos, ativava o eixo HHA de ratos, produzindo um aumento da liberação do CRH por neurônios hipotalâmicos (BERKENBOSCH et al., 1987). Mostraram, também, que a IL-1 atua diretamente na liberação de ACTH pela hipófise anterior, aumentando a liberação de GC pelas glândulas adrenais (BERKENBOSCH et al., 1987; GWOSDOW et al., 1992). Blalock et al, em 1985 também já haviam descrito que células do SI eram capazes de sintetizar e secretar hormônios, neurotransmissores e neuropeptídeos similares aos liberados pelo SNC, os quais interagem com receptores comuns presentes em células do SNC e SI (BLALOCK; BOST; SMITH, 1985). Dessa forma, devido à sua extensão e complexidade, os estudos das interações neuroimunes têm despertado o interesse de vários grupos de pesquisa, incluindo-se aqui o nosso (ALVES; PALERMO-NETO, 2007).

Especificamente com relação ao eixo HHA, considera-se o CRH como um dos principais hormônios associados com a regulação imunológica desencadeada através do eixo, estando ela diretamente relacionada com interações endócrinas, nervosas e imunológicas (KIM; LAWRENCE, 2000). Por sua vez, esta ativação modula as respostas ligadas às situações de estresse e de ansiedade (GRAEFF,

HUNZIKER, 1989; COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010). No que diz respeito à atividade do SI, o principal agente do eixo HHA é o CRH que, juntamente com outros fatores hipotalâmicos como a vasopressina, alcança a adenohipófise (SCOTT; DINAN, 1998). O CRH após ser liberado, liga-se a receptores hipofisários estimulando a produção e liberação do ACTH, que após liberado na circulação induzirá a secreção de GC pela zona fasciculada do córtex da adrenal (SCOTT; DINAN, 1998; ELENKOV et al., 2000). Os níveis de CRH são positivamente regulados pelos sistemas serotoninérgicos, colinérgicos e catecolaminérgicos centrais, entre outros. Desta forma, alterações nesses neurotransmissores, justificam as mudanças comportamentais e endócrinas indicativas de estresse (GARRIGA et al., 2006). Outras alterações relacionadas ao SNC como medo, ansiedade e depressão, também estão relacionados a um aumento da atividade do eixo HHA; esse aumento têm correlação positiva com déficits na imunidade relacionado ao número de células esplênicas; capacidade de proliferação de linfócitos B, linfócitos T auxiliares e T citotóxicos; atividade e número de células *natural killer* (NK); e atividade de macrófagos (COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010).

Neste sentido, a secreção de GC é uma clássica resposta endócrina do organismo frente ao estresse, apesar de ainda existirem contradições referentes às funções desse composto. Em trabalhos aonde é feita a administração de GC exógenos, identificaram-se efeitos semelhantes aos causados pelo estresse nos animais nos quais a liberação foi endógena. Os GC são compostos lipofílicos capazes de atravessar livremente as membranas celulares. Seus receptores são fatores de transcrição que, uma vez ativados por ligantes, regulam positivamente ou negativamente a expressão de genes alvos.

As funções exercidas pelos GC podem ser divididas em duas classes de ações: moduladora, que altera a resposta do organismo ao agente estressor; e preparatória, que altera a resposta do organismo para um estresse subsequente, ou seja, está relacionada a um processo de adaptação do organismo. Especificamente, com relação às ações preparatórias, elas podem ser divididas em: permissivas, as quais facilitam a ação de outros sistemas que participam na fase inicial de resposta ao estresse, preparando os mecanismos de defesa do organismo; supressivas, as quais são uma consequência da liberação de GC evitando consequências negativas

de uma resposta excessiva (inibição do SI, resposta inflamatória e atividade do eixo HHA); e estimuladoras, que se iniciam uma hora ou mais após o início do estresse, potencializando os efeitos de outros hormônios liberados e, conseqüentemente, de processos como a lipólise e a gliconeogênese (SAPOLSKY; ROBERT; ROMERO, 2000).

Além dos componentes já citados, que estão presentes na interface neuro-imuno-endócrina, as citocinas também são consideradas fundamentais, auxiliando na manutenção da homeostase orgânica. Elas são produzidas por diferentes tipos celulares e participam das respostas imunes inata e adquirida (HAN et al., 2010). Nesse sentido, a secreção de IL-2 é a chave da ativação das células T, fazendo com que elas entrem na fase S do ciclo celular, se proliferem e se diferenciem para a geração de células T efetoras. Posteriormente, as células T auxiliares, inicialmente imaturas, se tornam T *helper* 1 (Th1) ou T *helper* 2 (Th2) efetoras. Todo esse processo depende do antígeno e do microambiente de citocinas, que por sua vez é modula a expressão de genes (LIBERMAN; REFOJO; ARZT, 2003).

Dentre os diferentes tipos celulares que podem secretar as citocinas e as respectivas citocinas que podem ser secretadas, é possível fazer uma divisão em dois perfis de resposta, chamadas de Th1 e Th2. As citocinas do perfil Th1 estão associadas com a síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-2 e interferon gama (IFN- γ), referentes à imunidade celular, ou seja, induzem diferenciação de macrófagos, células NK e células T citotóxicas, envolvidas na fagocitose e destruição de bactérias invasoras e corpos estranhos. As citocinas de perfil Th2 estão associadas com a secreção de IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 (citocinas antiinflamatórias), referentes à resposta humoral, ou seja, induzem diferenciação de eosinófilos, mastócitos e células B, que levam a uma defesa a antígenos mediada por anticorpos. Dessa forma, pode-se dizer que dependendo do tipo de estímulo estressor, poderá haver um direcionamento Th1 ou Th2 (GLIMCHER; MURPHY, 2000) o que, por sua vez, influencia a resposta imune específica contra o patógeno ou contra o desafio ambiental.

Há que se considerar, ainda, que como uma consequência do estresse pode haver uma mudança do perfil de citocinas Th1 para Th2 (ELENKOV et al., 2000), a partir da inibição da expressão de genes para citocinas e de suas ações pleiotrópicas sobre as células alvo. Acredita-se que esses efeitos aconteçam devido

à ação do GC a partir da alteração de receptores: bloqueando (pelo mecanismo de transrepressão) a atividade transcricional de T-bet, que é considerado o principal fator de transcrição envolvido na resposta Th1 (LIBERMAN et al., 2007). Assim, inibe-se, via RNA mensageiro, a expressão de proteínas e a ativação transcricional de GATA-3, que é um fator de transcrição envolvido na resposta Th2 (LIBERMAN et al., 2009).

Shini et al. (2008) mostraram que a administração de corticosterona exógena (em níveis semelhantes aos observados endogenamente durante um estresse) em frangos de corte, aumentou a relação heterofilo/linfócito e induziu mudanças ultraestruturais no tamanho, formato e granulação de heterofilos e nas características citoplasmáticas de linfócitos. A corticosterona também induziu um aumento no influxo de heterofilos imaturos para o sistema circulatório. Dentro desse contexto, Shini et al. (2010) mostraram que a administração crônica de corticosterona em frangos de corte foi capaz de modular os níveis de citocinas e de quimiocinas, diminuindo a expressão de RNA mensageiro para citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e IL-18); sugeriram que os achados experimentais que observaram tenham sido em decorrência de uma diminuição da resposta imune. (EDENS; SIEGEL, 1975).

Outra forma de regulação do SI está relacionada à auto-tolerância e à proteção a agentes estranhos através do mecanismo de inibição, feito por citocinas produzidas por células Th1, Th2, Th17 e linfócitos T regulatório (Treg). As células Treg são conhecidas por atuarem através da supressão da secreção de fatores solúveis (como as citocinas anti-inflamatórias) e suas funções são controladas por células apresentadoras de antígeno. Esse grupo de células é capaz de suprimir a proliferação de células T, a produção de citocinas e a função das células apresentadoras de antígeno (VAN MAREN et al., 2008; SHINI et al., 2010).

Como já comentado, outra via relevante de comunicação entre SNC com o SI, é o SNS. Trata-se de um sistema chave para as funções cardiovasculares, metabólicas e imunes em resposta aos agentes estressores (STODDARD et al., 1986); atua na manutenção da homeostase frente a desafios agudos ou crônicos (ELENKOV et al., 2000). As catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) tem importante papel na resposta orgânica clássica de luta e fuga; também possuem importante função imunomoduladora após um estímulo estressor por ação das

catecolaminas em adrenoceptores α e β (NANCE; SANDERS, 2007). As catecolaminas induzem aumento ou supressão da atividade de células do SI, em especial a partir da proliferação celular, produção de citocinas e anticorpos, atividade lítica e migração celular (MADDEN; SANDERS; FELTEN, 1995; KELLEY et al., 1996).

Dentre os órgãos linfoides, sabe-se ter o timo apresenta grande importância na imunidade de frangos de corte e nas demais espécies. Trata-se de um sítio primário de desenvolvimento de células T e um dos órgãos centrais para a comunicação neuroendócrina. Células T precursoras migram continuamente da medula óssea para o timo, onde se proliferam, adquirem propriedades e se maturam a partir de influências neuroendócrinas (ENGLER et al., 2004). As células recém-geradas e que sobrevivem ao processo de seleção realizado no timo, deixam o órgão como células *naïve* CD4⁺ ou CD8⁺ e se tornam integrantes dos diferentes *pools* celulares do sangue periférico (HOSSEINZADEH; GOLDSCHNEIDER, 1993). Em frangos, o timo é consideravelmente sensível a estressores agudos e crônicos, que resultam em involução do órgão devido à apoptose (NEYLAN, 1998). Observou-se que esse colapso causado pelo estresse geralmente é transitório e não induz alterações persistentes no timo. Porém, outro estudo em frangos de corte mostrou que o estresse induziu uma redução de células T no sangue periférico e uma persistente supressão da proliferação da resposta das células T (DOMÍNGUEZ-GERPE; REY-MÉNDEZ, 1997; ENGLER et al., 2004).

A bursa de Fabricius é um órgão linfóide crítico para o desenvolvimento normal dos linfócitos B, responsáveis principalmente pela produção de anticorpos (GLICK, 1991). A diferenciação das células da linhagem B e a produção de anticorpos ocorrem em seus folículos, acompanhados por uma diferenciação de imunoglobulinas. Alguns estudos reportaram a presença de peptídeos de baixo peso molecular em órgãos linfoides de aves, que poderiam induzir uma variedade de respostas imunes *in vivo* e *in vitro* (FENG et al., 2011).

A primeira descrição da inervação catecolaminérgica em órgãos linfoides (timo e baço) foi feita por Felten et al. (1987) em camundongos; o grupo descreveu a presença de inervações simpáticas em justaposição com células ligadas à imunidade inata e adquirida, formando uma rede de comunicação que se conecta a leucócitos individuais. Essas interações são observadas em respostas a diferentes

estímulos, na dependência dos seguintes fatores: o tipo de receptor adrenérgico envolvido, o antígeno utilizado como estímulo/desafio, a dose da molécula agonista, e os subtipos de células imunes envolvidas (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996). De modo geral, as catecolaminas estão associadas com a inibição da atividade de macrófagos, neutrófilos ou células NK, ou seja, células associadas com a imunidade adquirida (SELIGER et al., 2012). Ramer-Quinn et al. (2000) observaram, em cultura de linfócitos, que a NA diminuiu a produção do fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$), interferon gama ($IFN\gamma$), IL-2 e IL-12 (citocinas pró-inflamatórias). Kohm e Sanders (2000) também demonstraram que a noradrenalina promoveu a diferenciação de células T CD4+ naive em células Th1 efectoras, produtoras de $IFN\gamma$. Também mostrou-se que células B expressam duas vezes mais receptores $\beta 2$ adrenérgicos do que as células T CD4+. De fato, esse tipo de receptor está presente em quase todas as células do SI, inclusive nos macrófagos, com exceção dos clones tipo Th2 (BLASI et al., 1995). Os receptores $\alpha 2$ adrenérgicos, no entanto, somente são expressos em linfócitos T e B e durante estados específicos como por exemplo, em doenças autoimunes (por exemplo, na artrite reumatoide) (KUIS et al., 1996).

Neste sentido, o estresse ativa o SNS, aumenta a liberação de noradrenalina que, atuando nas células do SI, causa imunossupressão e aumenta a susceptibilidade orgânica a patógenos externos. Observou-se que uma simpatectomia química induzida por 6-hidroxidopamina aumentou a porcentagem de neutrófilos no baço, assim como o número de macrófagos peritoneais em camundongos; quando animais assim tratados foram infectados com *Listeria monocytogenes*, observou-se diminuição do número de unidades formadoras de colônia, aumento do número de neutrófilos, redução do número de linfócitos no baço e secreção de IL-2 e $INF-\gamma$. Em conjunto, esses fatos culminaram em redução da resposta imune adquirida para processos infecciosos (RICE et al., 2001, 2002).

Em frangos de corte, Cheng (2006) avaliaram a habilidade do SNS em regular a imunidade das aves a partir da administração de clonidina (agonista de receptor α -2 adrenérgico que atua no SNC e no SNS); avaliaram a concentração plasmática de IgY e da porcentagem da população circulante de linfócitos. Observaram que, em comparação às aves do grupo controle, aquelas tratadas com clonidina apresentaram uma maior concentração de IgY e maior porcentagem de

linfócitos B e T citotóxicos; relataram, ainda que a porcentagem de linfócitos T auxiliares não se alterou. Desta forma, sugeriram que o SNS estaria envolvido diretamente com a regulação do SI, via regulação por meio de receptores α -2 adrenérgicos. Em outro estudo, mostrou-se que a inoculação de LPS em frangos de corte jovens aumentou os níveis de corticosterona e a temperatura corporal dos mesmos, produzindo diminuição da ingestão de alimentos e comportamento doentio, além de alterações do SNS (SELL; CROWE; KENT, 2003).

Não se deve esquecer, no entanto, que o sistema neuroimune é interconectado e, desta forma, as atividades do eixo HHA e o SNS também podem interagir sendo controlados pelo SNC (BESEDOVSKY; HO; DEL REY, 1996).

A maior parte dos conhecimentos gerados sobre o funcionamento do sistema neuroimune nos últimos 20 anos foi obtido a partir de estudos feitos em animais de laboratório. Muito precisa ser estudado a esse respeito em animais de produção, fato que tem levado alguns pesquisadores a se interessarem pelo estudo das relações entre neuroimunomodulação, estresse e avicultura (MASHALY et al., 2004; KAISER, 2010; QUINTEIRO-FILHO et al., 2010; QUINTEIRO-FILHO et al., 2012).

2.2 Estresse, Imunidade e Vacinação em Frangos de Corte

No passado, as interações imunoneuroendócrinas eram pouco analisadas ou relatadas em animais de produção. Sabe-se hoje que aves, bovinos, ovinos, suínos e bubalinos apresentam queda em parâmetros produtivos e imunológicos quando submetidos ao estresse, este fato têm aumentado o número de estudos e trabalhos publicados nesta linha de pesquisa (MORROW-TESCH; MCGLONE; SALAK-JOHNSON, 1994; KHONGDEE et al., 2006; GUPTA; EARLEY; CROWE, 2007; CAFE et al., 2011; SEVI et al., 2013).

Um dos primeiros trabalhos a serem realizados para estudar a associação entre o estresse térmico por calor e a resposta imune de frangos de corte foi o desenvolvido por Thaxton, Sadler e Glick (1968); nele frangos de corte jovens foram submetidos a uma temperatura de 44,4 a 47,8°C. Os autores observaram uma supressão de células brancas circulantes e um aumento da quantidade de

heterofilos circulantes. Há evidências, em frangos de corte, que mostram ser o estresse capaz de suprimir seletiva e potencialmente a imunidade celular e humoral, com conseqüente: morbidade, mortalidade, falha no desenvolvimento da resposta imune de aves vacinadas, e involução de órgãos do SI como bursa, timo, baço e fígado (SHINI; KAISER, 2009; SHINI et al., 2008, 2010). Na situação de estresse, em resposta ao aumento da liberação de GC, observa-se a inibição da produção de linfócitos B e da proliferação de linfócitos T (BUTTGEREIT; SCHEFFOLD, 2002; ENGLER, 2003). Evidências também têm sugerido que GC e as catecolaminas inibem citocinas e quimiocinas em aves, induzindo uma modulação das populações de células imunes (DHABHAR; MCEWEN, 1997; MACARIO; MACARIO, 2000; CALCAGNI; ELENKOV, 2006). Entretanto, o mecanismo neuroimune associado a essa relação, principalmente no que se refere à maior suscetibilidade para doenças (infecções secundárias), ainda não foi completamente elucidado.

Com relação especificamente às aves de produção, dentre os diferentes tipos de estresse que podem ser analisados, os mais frequentemente relatados na literatura são: superlotação (HECKERT et al., 2002), frio (CHEN; JIANG; GENG, 2012; ZHAO et al., 2013) e calor (QUINTEIRO-FILHO et al., 2010; QUINTEIRO-FILHO et al., 2012).

Neste sentido, muito tem sido abordado sobre as influências do estresse causado pela alta densidade populacional sobre a produção de aves. De forma geral, a literatura mostra que frangos mantidos em superlotação apresentaram diminuição da atividade imune. Em nossos laboratórios, constatamos que o estresse por aumento da densidade populacional (16 animais/m²) foi capaz de diminuir a atividade de macrófagos, de causar lesão intestinal e, conseqüentemente de aumentar a invasão de *Salmonella enteritidis* para o fígado de frangos de corte (GOMES et al., 2013)¹. Observou-se também que uma densidade populacional de 20 aves/m² diminuiu significativamente o peso total e o peso relativo da bursa de Fabricius, em relação a um grupo controle mantido em uma densidade de 10 aves/m². Têm sido identificadas alterações sobre o crescimento, mortalidade, incidência de problemas de pernas, doenças secundárias e o próprio comportamento (HECKERT et al., 2002; ESTEVEZ, 2007). Além disso, mostrou-se

¹ ¹Overcrowding stress decreased macrophage activity and increased *Salmonella enteritidis* invasion in broilers chickens. Gomes, A.V.S; Quinteiro-Filho, W.M.; Ribeiro, A.; Ferraz-de-Paula, V. Pinheiro, M.L.;Baskeville, E.; Astolfi-Ferreira, C.S.; Ferreira, A.J.P; Palermo-Neto, J. Avian Pathology. Enviado para publicação em janeiro de 2013.

que o estresse por aumento de densidade populacional também afetou os índices zootécnicos do plantel, reduzindo o ganho de peso e o consumo de ração e aumentando a conversão alimentar; além de gerar canibalismo, desequilíbrio social, limitações de movimento e de comportamento de liderança (NÄÄS et al., 2004). Já em um estudo no qual foi avaliada uma densidade de 45kg/m² por 5 dias sobre os parâmetros termofisiológicos em frangos Ross de 43 dias, observou-se uma elevação da temperatura corpórea, associada com prejuízos ao bem-estar dos animais (ABUDABOS et al., 2013).

Da mesma forma que os demais tipos de estresse, o frio induziu importantes efeitos na saúde e no bem estar das aves. Temperaturas mais baixas que 18°C podem induzir lesões permanentes em tecidos e uma maior predisposição a outras afecções. Zhao et al. (2013), observaram que aves expostas ao estresse agudo e crônico pelo frio apresentaram uma maior expressão de IgM, IgG, IL-7 e principalmente do receptor polimérico de imunoglobulina (plgR) no duodeno e no jejuno. Além disso, também foram observadas lesões histológicas nas aves pertencentes ao grupo estressado. Em outro estudo desenvolvido por Zhang et al. (2011) foram avaliadas as mudanças induzidas pelo frio na função antioxidante induzida pela óxido-nítrico-sintetase (iNOS) no duodeno de frangos. Os resultados mostraram que o estresse agudo pelo frio aumentou a atividade da iNOS no duodeno dessas aves, com decréscimo posterior do RNA mensageiro para iNOS. O estresse crônico, por sua vez, produziu efeito oposto, isto é, redução, seguida por aumento da atividade do óxido nítrico e da expressão do RNA mensageiro para iNOS. Desta forma, o autor concluiu que o estresse térmico pelo frio (agudo ou crônico) modulava o SI da ave de forma a induzir estresse oxidativo e modificação de iNOS no duodeno. Um trabalho desenvolvido por Mujahid e Furuse (2009) mostrou que pintinhos expostos a baixas temperaturas apresentaram anormalidades comportamentais como, por exemplo, redução da vocalização e, também, da atividade locomotora espontânea; apareceu, ainda, um comportamento chamado “sleep-like”, caracterizado por maior prostração (aves sentadas e de olhos fechados); e redução da capacidade produtiva, quando avaliada nos animais adultos.

De forma geral, as aves na primeira semana de vida precisam ser mantidas em uma temperatura mais elevada devido ao desenvolvimento incompleto do

sistema termorregulador. Nesta idade, a temperatura ambiente pode chegar a 30°C, sendo que qualquer problema ambiental tem consequências que perduram durante todo o ciclo produtivo, resultando em perdas econômicas ao criador. Porém, a partir de 5 a 7 dias de vida, a temperatura ambiente ideal se reduz de forma proporcional à idade das aves; o sistema termorregulador se desenvolve até a maturidade, há aumento das reservas energéticas e o metabolismo se torna cada vez mais elevado, ou seja, há um aumento gradativo da necessidade de perda de calor. A última semana antes do abate, exige um maior cuidado maior com a temperatura devido ao risco de morte que pode representar para as aves. De fato, a zona de conforto térmico é reduzida para 24°C às 4 semanas de idade e depois para 21-22°C às 6 semanas de idade (FURLAN, 2006).

Neste sentido, quando da análise dos efeitos do estresse por calor, foco deste trabalho, deve-se primeiramente considerar que o frango de corte é um animal doméstico geneticamente aprimorado para um rápido crescimento e deposição muscular. Esse desempenho produtivo atinge, hoje, índices significativamente elevados, resultando em aves com metabolismo mais acelerado (LAGANA, 2005) o que, conseqüentemente, dificulta sua capacidade de enfrentar altas temperaturas e umidade ambientes. Quando a temperatura ambiente se eleva acima da zona de termoneutralidade, a ave é submetida a uma condição de estresse, podendo ele gerar hipertermia, alcalose respiratória, desequilíbrio eletrolítico, redução do consumo de alimento e da taxa de crescimento, aumento na mortalidade e/ou, até mesmo, alteração da qualidade da carne. De fato, o estresse acaba interferindo diretamente com o rendimento industrial, com a capacidade de retenção de água, com a cor e com a maciez da carne (BROSSI et al., 2009).

Nos dias de hoje, pode-se considerar o calor como um dos maiores responsáveis por perdas econômicas na criação intensiva de frangos de corte (FURLAN, 2006). Quando excessivo, o calor pode levar a sérias lesões em tecidos ou até mesmo à morte da ave (HALEVY et al., 2013). Uma ave submetida a estresse térmico por calor apresenta características que buscam amenizar o desconforto causado pela alta temperatura e aumentar a superfície e a capacidade de perda de calor para o ambiente, são elas: afastamento das asas do corpo, eriçamento das penas, e desvio da corrente sanguínea de órgãos (como fígado, rins e intestinos) para a circulação periférica. Outra forma de perda de calor é a não

evaporativa, que se reflete por um aumento do consumo de água com consequente aumento da produção de urina, reduzindo a qualidade da cama e aumentando problemas com calos de patas (BORGES et al., 2003). Após anos de estudos sobre a fisiologia da regulação térmica e suas consequências para o bem-estar da ave e para o sistema produtivo, demonstrou-se que é importante manter níveis de temperaturas ideais durante a criação, isto é, que mantem as aves em situações confortáveis de temperatura desde a eclosão até o momento do abate.

Em nossos laboratórios, Quinteiro-Filho et al. (2010) avaliaram os efeitos de um estresse térmico por calor em frangos de corte sobre parâmetros neuroimunes. Para tanto, as aves foram submetidas à temperatura ambiental de 31°C e 36°C durante 10 horas por dia (do 35º ao 41º dias de vida). Os resultados mostraram que os animais estressados tiveram em relação aos do grupo controle mantido a 24°C, menor ganho de peso; redução do consumo de ração e do peso relativo dos órgãos linfoides; maiores níveis séricos de corticosterona; aparecimento de infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário na lâmina própria do jejuno. Além disso, em outro trabalho desenvolvido por nosso grupo de pesquisa, Quinteiro-Filho (2012) observaram que o estresse térmico (31°C) aplicado do 35º ao 41º dias de vida de frangos de corte infectados com *Salmonella enteritidis* ativou o eixo HHA, estimulando a produção de citocinas intestinais e reduzindo o consumo de ração, o ganho de peso vivo e a atividade de macrófagos. Desta forma, o estresse foi considerado um fator importante para a manutenção da integridade intestinal, e do desempenho e ainda para a prevenção contra infecções por *Salmonella enteritidis*. Imik et al. (2012) relataram que o estresse térmico por calor também reduziu o peso vivo de frangos alimentados com concentrações de 190g/kg e 210g/kg de proteína relataram, ainda, aumento de oxidação lipídica na cocha e na asa, que são importantes em termo de rendimento em abatedouros.

Além das alterações de produtividade, já foram identificadas alterações causadas pelo estresse térmico no metabolismo e no SI (DONKOH, 1989; RICE et al., 2001; MASHALY et al., 2004; LI et al., 2011). Estudos realizados com diferentes espécies de aves têm estabelecido que o estresse aumenta o número de polimorfonucleares na circulação (neutrófilos, ou heterófilos em aves) e reduz os linfócitos e, conseqüentemente, altera a proporção heterófilo/neutrófilo:linfócito (H:L). No trabalho desenvolvido por Shini e Kaiser (2009) e Shini (2008), a

administração exógena de corticosterona e LPS induziram um aumento significativo da razão H:L, associada a uma redução da contagem de linfócitos na circulação periférica e um aumento do número de heterofilos. Esta resposta do organismo sugere que a alta concentração de corticosterona no organismo auxilie na redistribuição dos leucócitos entre compartimentos (sangue e tecidos linfoides e não linfoides), aumentando as concentrações de células relacionadas a uma resposta inespecífica (heterofilos, por exemplo) na corrente sanguínea, quando do estresse (COHEN, 1972). Esse mecanismo, uma resposta evolucionária adaptativa e conservadora, contribui para a melhora da vigilância imunológica (antibacteriana principalmente) em órgãos e tecidos de aves nos quais os leucócitos trafegam durante o estresse (MISHLER, 1976; DHABHAR; MCEWEN, 1997; ASCHBACHER et al., 2013; DHABHAR, 2013).

Mashaly et al. (2004) avaliaram os efeitos do estresse térmico na performance e na qualidade de ovos de poedeiras comerciais e identificaram uma redução significativa de peso e do consumo de ração; redução dos parâmetros de qualidade do ovo, como produção, peso e casca; redução do número de leucócitos na corrente sanguínea, da produção de anticorpos, e da mortalidade; mas, não observaram modificações significantes na atividade de linfócitos B e T. Dessa forma, sugeriram que o estresse por calor prejudicou a qualidade produtiva das poedeiras e inibiu as funções imunológicas das aves. Qureshi, Hussain e Heggen, (1998) identificaram insultos causados por agentes virais ou bacterianos específicos que resultaram em atrofia dos órgãos linfoides, alteração de subpopulações específicas de células linfoides, e, até mesmo em necrose desse tecido.

Tendo em vista as relações existentes entre o SNC e SI em frangos de corte, pareceu-nos relevante avaliar os efeitos do estresse sobre parâmetros imunológicos de frangos de corte frente a um desafio vacinal. Neste sentido, considera-se a vacinação uma das práticas mais comuns na criação de animais de produção, essencial para um correto manejo e proteção dos animais contra agentes infecciosos. Atualmente há no mercado um grande número de vacinas para diferentes agentes infecciosos que acometem frangos de corte. Dentre elas, destaca-se uma pela importância no panorama mundial: a Doença de Newcastle (DN).

De fato, apesar do avanço da tecnologia diagnóstica e das técnicas de vacinação, a doença continua a impactar negativamente a produção de aves (ERDEI et al., 1987; TAYLOR et al., 2012). A DN é classificada como uma doença produzida por um RNA vírus, envelopado e pertencente à ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae* e gênero *Avulavirus*; a infecção em aves ocorre através das mucosas. Mais especificamente, esses vírus são isolados e classificados em patotipos baseados nas manifestações clínicas que produzem, sendo que o de maior patogenicidade apresenta 100% de mortalidade em várias espécies animais, sendo responsável por consideráveis perdas econômicas (TSENG et al., 2009; TAYLOR; ALEXANDER, 2011; LUO et al., 2013; SNOECK et al., 2013). Sabe-se que o vírion da DN apresenta uma estrutura pleiomórfica e que existem pelo menos três diferentes genomas (15,186, 15,192 ou 15,198) que produzem seis proteínas estruturais: nucleocapsídeo, fosfoproteína, matriz, fusão, hemaglutinina-neuroaminidase e RNA dependente de RNAPolimerase (CZEGLÉDI et al., 2006).

A DN se encontra na lista “A” da Organização Internacional de Epizootias (OIE) devido à sua alta patogenicidade e à capacidade que tem de difusão, com sérias consequências socioeconômicas, sendo de grande importância para o comércio internacional de animais e de seus subprodutos (MACARI et al., 2008). Destaque-se que a partir do diagnóstico da DN, as aves criadas em nosso país devem ser sacrificadas conforme exigências do Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNAS); além disso, a notificação da doença deve ocorrer a nível internacional, trazendo este fato problemas relevantes para as exportações.

As manifestações clínicas observadas durante a DN são inespecíficas e podem incluir depressão, penas eriçadas, anorexia, apatia e hipotermia antes da morte. As lesões observadas no pós-morte não são patognomônicas, como aquelas observadas em outras doenças infecciosas como a influenza aviária, laringotraqueíte aviária e a micoplasmose (ECCO et al., 2011; TAYLOR et al., 2012). Porém, se forem observadas na necrópsia hemorragia e necrose de tecidos linfoides, especialmente no intestino, baço e timo, pode se suspeitar da presença da DN (DE BATTISTI et al., 2013).

Imunologicamente, a DN reduz o tamanho de órgãos linfoides e induz apoptose de linfócitos e células mononucleares do sangue periportal, aumentando a suscetibilidade das aves a infecções secundárias. Em um trabalho desenvolvido por

Hu et al. (2012), foi inoculado *in vitro* um isolado de o vírus da DN (vND) em baços de frango de corte para a avaliação da resposta imune; observou-se uma forte reação imunológica com necrose de esplenócitos. Com relação ao tipo de imunidade desenvolvida a partir do estímulo criado pelo vDN, um trabalho desenvolvido por Al-Zubeedy (2009) mostrou ser a imunidade humoral o componente chave para o sucesso da proteção orgânica contra o vDN.

O controle da DN é feito rotineiramente através de vacinação, o que é regularmente praticado na maioria das granjas (GALLILI, 1998). A proteção contra o vDN se baseia na produção de anticorpos, a partir da detecção de proteínas virais envolvidas nos processos de adesão e na fusão do vírus. Porém, o conhecimento dos fatores envolvidos na resposta imune das aves frente ao vDN ainda está restrito (KAPCZYNSKI; AFONSO; MILLER, 2013). Desta forma, acreditamos que o estudo dos efeitos do estresse por calor em aves vacinadas para a DN, uma enfermidade infecciosa de grande importância econômica, seja de valia para a compreensão da resposta vacinal da ave. É possível que alterações imunológicas desencadeadas pelo estresse causarem falhas no desenvolvimento da proteção das aves à DN. Este fato acarretaria problemas não somente a nível de produção em uma granja mas, também, no status sanitário e nas condições ambientais do plantel. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do estresse por calor sobre a atividade de linfócitos e a resposta vacinal ao paramixovírus (Doença de Newcastle) em frangos de corte.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar, dentro de uma perspectiva neuroimunológica, as relações existentes entre o estresse térmico por calor ($38\pm 2^{\circ}\text{C}$) e a resposta vacinal ao Vírus da Doença de Newcastle em frangos de corte.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um protocolo de estresse térmico por calor para a primeira semana de vida em frangos de corte;
- Avaliar em aves estressadas ou não por calor e vacinadas ou não para a Doença de Newcastle:
 - o peso relativo de baço, bursa e fígado;
 - os níveis séricos de IgM e IgY;
 - os níveis séricos de Corticosterona;
 - as populações de linfócitos B e T de sangue periférico por citometria de fluxo.
- Interpretar e correlacionar os dados obtidos dentro de uma perspectiva neuroimunológica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 96 frangos de corte da linhagem Cobb adquiridos de incubatório comercial com 1 dia de vida. Os animais foram mantidos nas dependências do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, conforme normas estabelecidas e aprovadas pelo Comitê de Bioética (protocolo de aprovação 2360/2011). As aves foram alojadas em quatro isoladores (com cama de maravalha), respeitando-se a densidade máxima de 12 aves/m². As aves receberam luz artificial de 12h durante o dia e foram observadas constantemente, verificando-se o seu estado de saúde e comportamento e computando-se eventuais mortes. A ração das aves foi do tipo comercial sem qualquer aditivo zootécnico melhorador de desempenho, sendo fornecida *ad libitum*.

4.2 Determinação dos grupos

Os animais foram divididos em dois grandes grupos, controle e experimental; o grupo controle foi formado por animais que não foram submetidos a um estresse por calor, e o grupo experimental por animais submetidos ao estresse por calor. Por sua vez, os dois grandes grupos foram subdivididos em outros 2 grupos cada, sendo um deles vacinado e o outro não vacinado. Portanto, trabalhamos com 4 grupos de aves que foram analisadas em três momentos diferentes: 7, 14 e 19 dias de vida. Abaixo se encontra a divisão dos grupos referidos neste projeto.

- Grupo controle (C): aves que não foram submetidas ao estresse térmico e não receberam a vacinação;

- grupo estressado (E): aves que foram submetidas ao estresse térmico ($38\pm 2^{\circ}\text{C}$) e não receberam a vacinação;
- grupo controle vacinado (C/V): aves que não foram submetidas ao estresse térmico e receberam a vacinação por via ocular (vírus da Doença de Newcastle cepa LaSota) aos 7 dias e reforço aos 14 dias;
- grupo controle vacinado (E/V): aves que foram submetidas ao estresse térmico ($38\pm 2^{\circ}\text{C}$) e receberam a vacinação por via ocular (vírus da Doença de Newcastle cepa LaSota) aos 7 dias e reforço aos 14 dias.

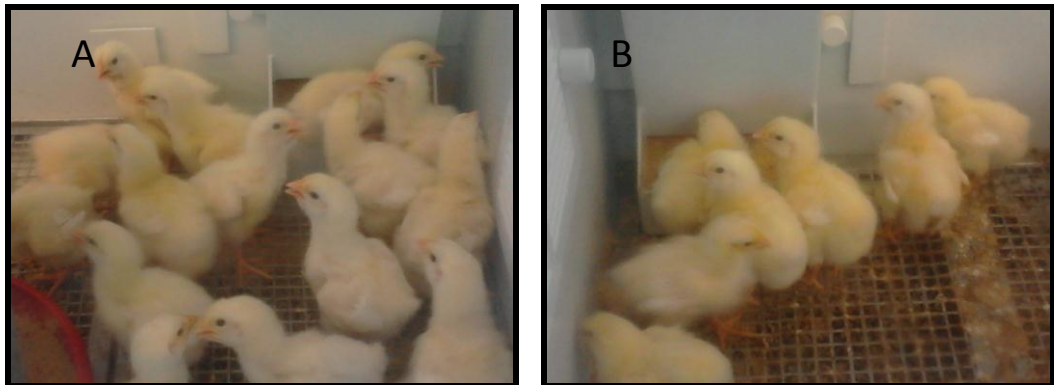
4.3 Procedimentos

4.3.1 Estresse Térmico

Nos experimentos já realizados em nossos laboratórios (QUINTEIRO-FILHO et al., 2010, 2012), as aves foram submetidas ao estresse térmico entre o 35º e o 42º dia de vida ($31\pm 1^{\circ}\text{C}$). No presente projeto, estipulou-se que as aves seriam submetidas a um estresse térmico por calor ($38\pm 2^{\circ}\text{C}$) do 2º e o 6º dia de vida. A escolha do estresse na primeira semana ocorreu de forma tal a permitir que fosse possível assegurar que o estresse causado pelo calor pudesse ser dissociado do estresse causado pela vacinação (feita aos 7 e 14 dias de vida); a observação da grande dificuldade na manutenção a campo da temperatura ideal de pintinhos na primeira semana de vida, principalmente nas estações mais quentes do ano dirigiu, também, a esta escolha do período de estresse.

No período analisado (primeira semana de vida das aves), apareceram comportamentos característicos de desconforto térmico nos animais estressados: animais com o bico aberto e asas abertas, o que foi acompanhado por aumento do consumo de água (fornecida *ad libitum*). A figura 1 mostra a postura das aves em duas situações distintas: estresse térmico por calor ($38\pm 2^{\circ}\text{C}$ – Figura 1A) e temperatura ideal para a idade ($30\pm 1^{\circ}\text{C}$ – Figura 1B).

Figura 1 – Aves pertencentes ao grupo submetido ao estresse térmico (Figura A) e aves do grupo controle (Figura B)



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Observar na Figura A, a presença de bicos abertos, referente à postura da ave frente ao estresse por calor.

4.3.2 Desafio com o Vírus da Doença de Newcastle (cepa La Sota)

Foi utilizada a vacina viva atenuada liofilizada comercial para a Doença de Newcastle (cepa La Sota) da Merial Saúde Animal Internacional Ltda. Para a inoculação, o conteúdo do frasco da vacina (liofilizada), contendo 1000 doses foi resuspendido em 10ml de um diluente apropriado conforme descrito na bula do produto e uma gota (0,03ml) foi administrada pela via ocular dos pintinhos aos 7 e aos 14 dias de vida.

4.3.3 Pesagem dos órgãos / Determinação do Peso Relativo

Após a colheita de sangue, os animais foram eutanasiados pelo método de deslocamento cervical, o que foi feito por profissionais previamente treinados. Para a colheita dos órgãos, foi feita a abertura da cavidade celomática, o isolamento e a remoção do baço, bursa e fígado. Os órgãos foram imediatamente pesados e os valores anotados em uma tabela. O peso relativo dos órgãos foi calculado a partir da divisão do peso do órgão pelo peso do animal, multiplicando por 100.

4.3.4 Análise dos Níveis Séricos de IgM e IgY

A colheita do sangue foi realizada pela veia braquial, na parte interior da asa; o sangue colhido foi armazenado em tubos do tipo eppendorf[®] de polietileno e permaneceu à temperatura ambiente até que ocorresse a retração do coágulo. Em seguida, ele foi centrifugado sob refrigeração (1500g/5min e temperatura ao redor de 8°C) para obtenção do soro, que foi armazenado em freezer à -80°C por no máximo 30 dias, até a realização das dosagens hormonais. As dosagens de IgM e IgY foram realizadas por *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) com o uso de *kits* comerciais (Bethyl Laboratories, Montgomery, EUA). Essas concentrações foram determinadas com o auxílio de uma curva padrão expressa em nanograma de imunoglobulina por mililitro de soro (ng/mL). Os resultados foram multiplicados pelo fator de diluição empregado no teste.

4.3.5 Quantificação dos Níveis Séricos de Corticosterona

A dosagem de corticosterona foi realizada com o uso de um *kit* comercial de ELISA (Arbor Assays, EUA), precedida pela 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 (pg/mL); os resultados foram multiplicados pelo fator de diluição empregado no teste.

4.3.6 Separação de Leucócitos do Sangue Total (Percoll)

As amostras de sangue foram colhidas pela veia braquial das aves e armazenadas em tubos do tipo eppendorf[®] de polietileno contendo *Ethylenediamine tetraacetic acid* (EDTA). Logo em seguida, ao sangue total foi adicionado RPMI (1:3) e Percoll[™] (GE Healthcare[®]) em um tubo falcon[®] de 15ml. Os tubos foram

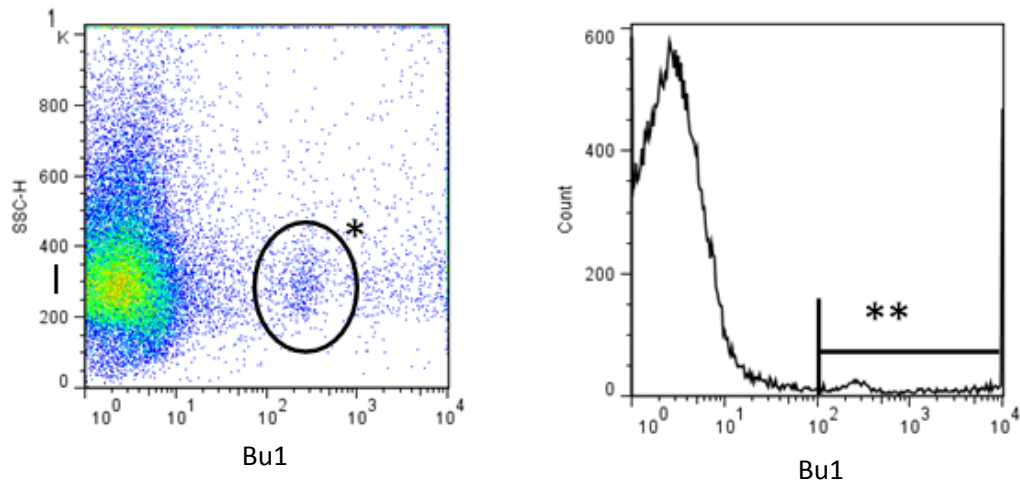
centrifugados por 5min à 1280g e 18°C. O aglomerado de leucócitos foi removido com o auxílio de uma pipeta automática, colocado em uma solução de *Phosphate Buffered Saline* (PBS) e centrifugado novamente por 10min a 300g e 18°C. Após essa etapa, removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o botão de leucócitos em 1ml de PBS.

4.3.7 Imunofenotipagem de Linfócitos B e T

Os leucócitos que foram obtidos a partir do método de Percoll descrito no item 4.3.6, foram incubados no escuro por 30 min com anticorpos específicos para cada tipo celular analisado: anti-CD3-FITC (linfócitos T totais), anti-CD4-PE (linfócitos T auxiliares), anti-CD8-PE (linfócitos T citotóxicos) e anti-Bu1-PE (linfócitos B). Em seguida, adicionou-se *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS), centrifugaram-se as amostras a 500x g por 5 minutos a 8°C. Finalizado, o sobrenadante foi descartado e 1ml da solução HBSS novamente adicionada. Para cada amostra analisada no citômetro de fluxo foram contados 30.000 eventos, com a utilização do “software” CellQuest[®] (BD). A partir desse protocolo, foram obtidos os dados de número e porcentagem de células das diferentes populações avaliadas (HAN et al., 2010), que foram analisados pelo software FlowJo[®] (Tree Star Inc[®], 2012).

As figuras de 2 a 5 ilustram as populações de células analisadas e os histogramas referentes às intensidades de fluorescência das células marcadas pelos respectivos anticorpos específicos.

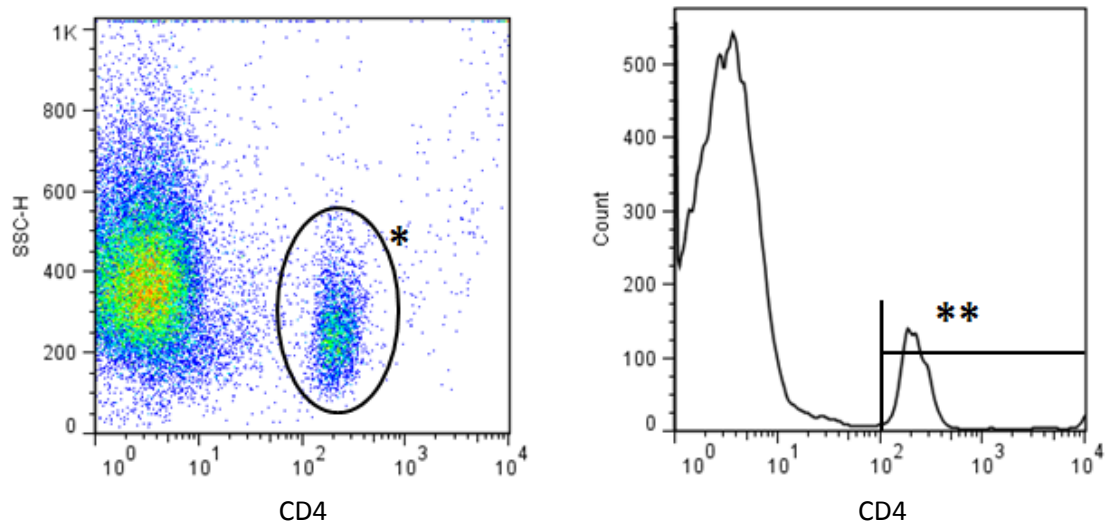
Figura 2 – Dot plot das populações de células (Complexidade X Bu1) e histograma da média de intensidade de fluorescência analisada (Bu) de células marcadas com anti-Bu1 (**Linfócito B**)



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: *População de linfócitos B (Bu1) **Pico de intensidade de fluorescência de Bu1 que representa a população selecionada no gate do dot plot ao lado.

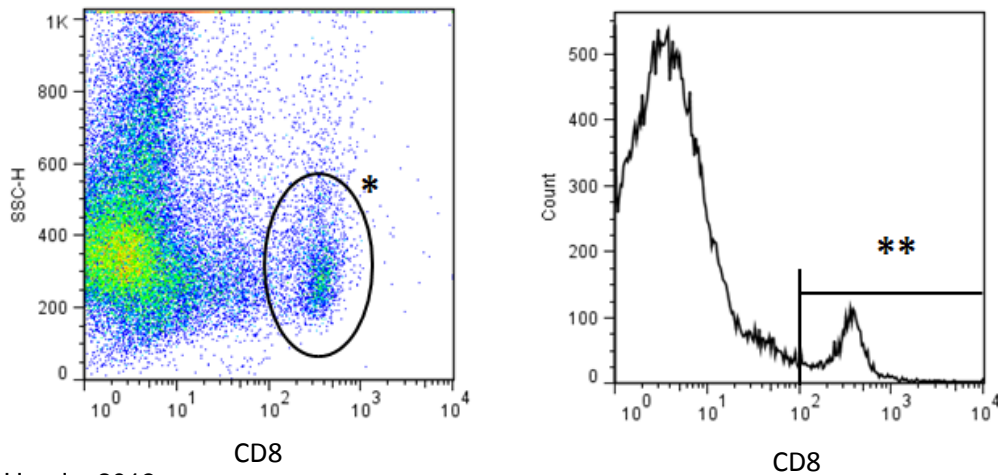
Figura 3 – Dot plot das populações de células (Complexidade X CD4) e histograma da média de intensidade de fluorescência analisada (CD4) de células marcadas com anti-CD4 (**Linfócitos T CD4+**)



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: *População de linfócitos T CD4+. **Pico de intensidade de fluorescência de FL2 que representa a população selecionada no gate do dot plot ao lado.

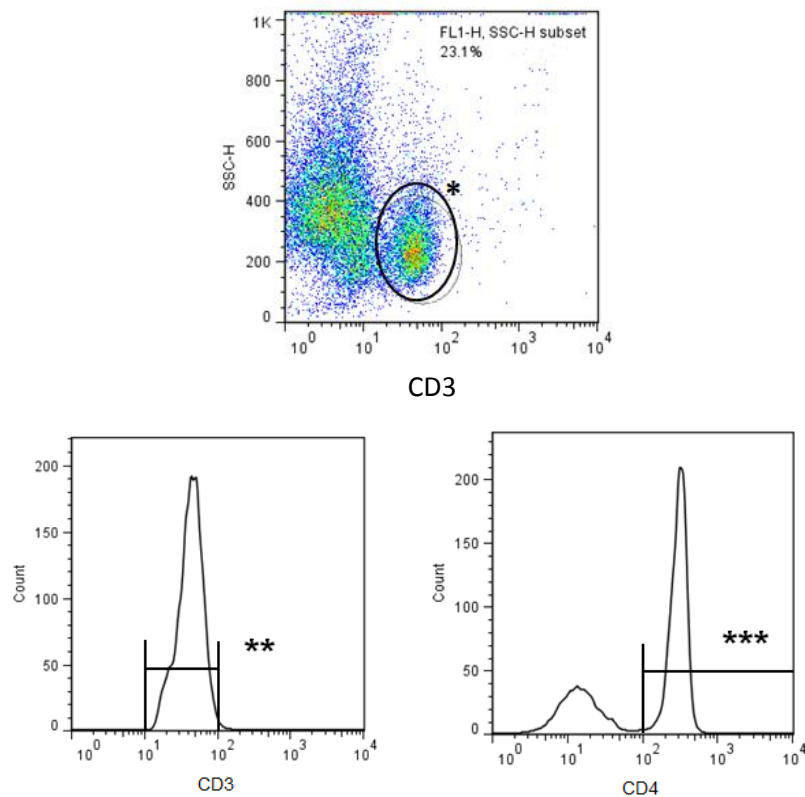
Figura 4 – Dot plot das populações de células (Complexidade X CD8) e histograma da média de intensidade de fluorescência analisada (CD8) de células marcadas com anti-CD8 (Linfócitos T CD8+)



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: *População de linfócitos T CD8+. **Pico de intensidade de fluorescência de CD8 que representa a população selecionada no gate do dot plot ao lado.

Figura 5 – Dot plot das populações de células (Complexidade X CD3) e histograma da média de intensidade das fluorescências analisadas (CD3 e CD4) de células marcadas com anti-CD3 (Linfócitos T totais) e anti-CD4 (Linfócitos T CD4+)



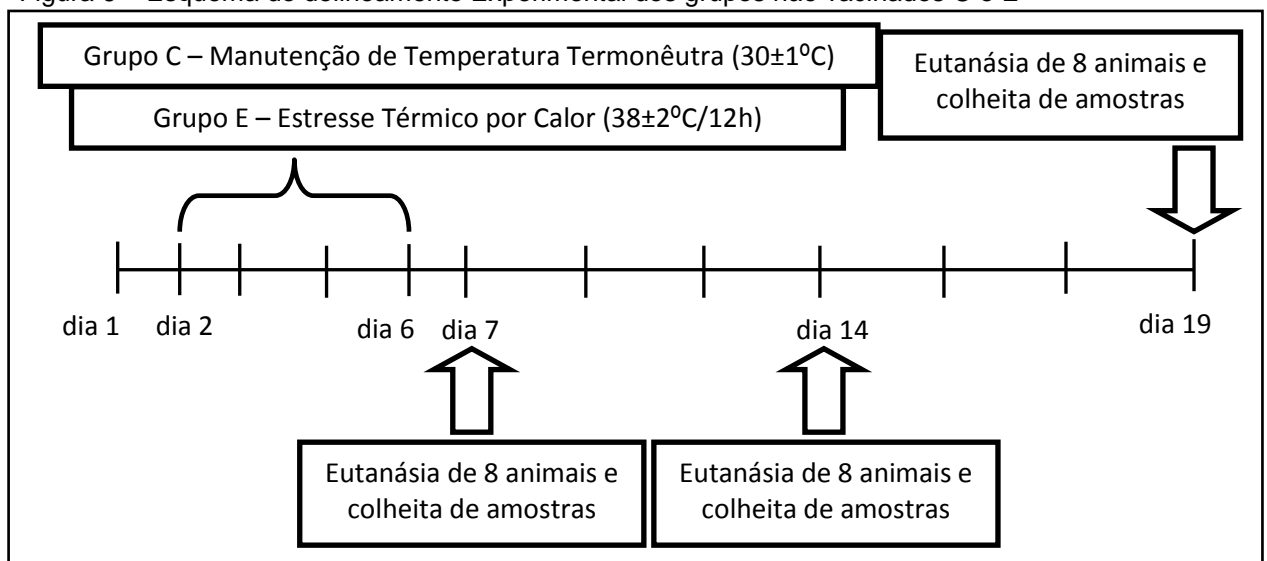
Fonte: Honda, 2013.

Legenda: *População de linfócitos T. ** Pico de intensidade de fluorescência em CD3 que representa a população selecionada no gate do dot plot acima. *** Pico de intensidade de fluorescência de CD4 que representa a população selecionada no gate do dot plot acima.

4.3.8 Delineamento Experimental

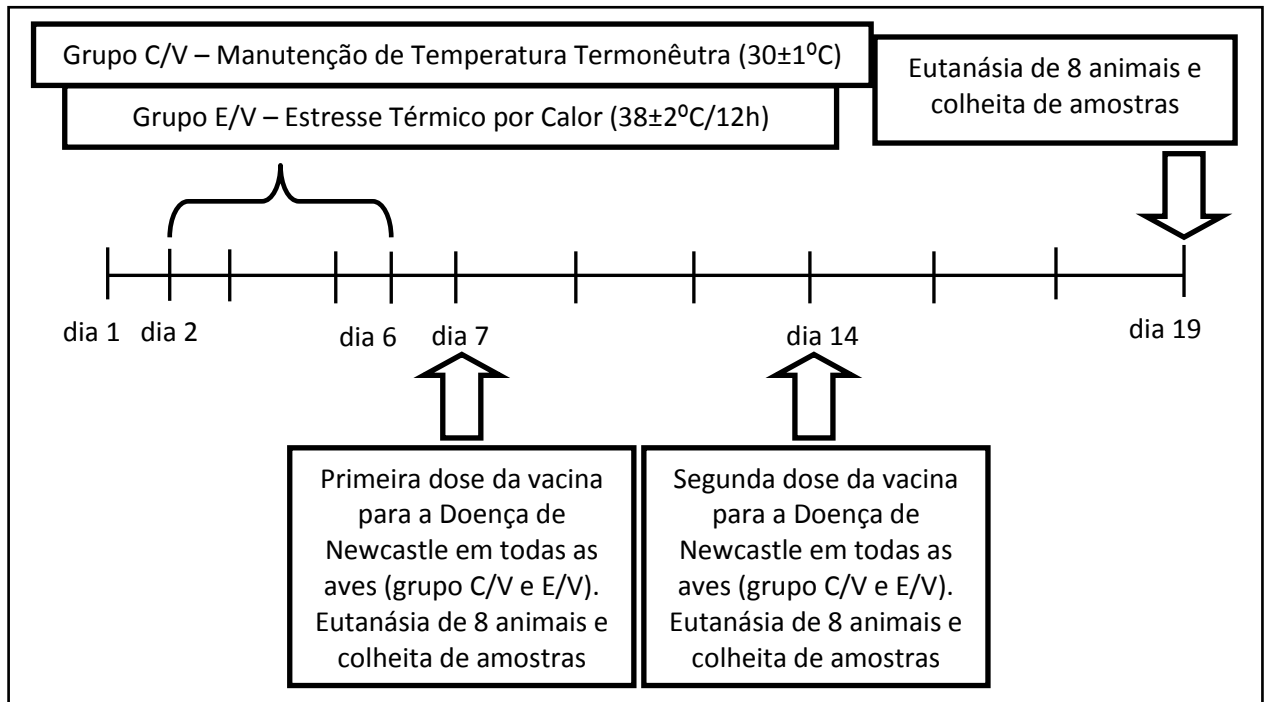
As figuras 6 e 7 ilustram o delineamento experimental realizado para os grupos que não receberam a vacina (Figura 6) e para aqueles grupos que receberam esta vacina (Figura 7). Em cada ponto citado (7, 14 e 19 dias de vida) foram retirados ao acaso 8 aves de cada grupo. Destas aves, foram feitas colheitas de sangue para as dosagens séricas (corticosterona e imunoglobulinas) e imunofenotipagem da população de linfócitos, conforme descrito em 4.4.5, 4.4.6, 4.4.7 e 4.4.8. Posteriormente, as aves foram eutanasiadas sendo os órgãos (baço, bursa e fígado) pesados como descrito em 4.4.3.

Figura 6 – Esquema do delineamento Experimental dos grupos não vacinados C e E



Fonte: Honda, 2013.

Figura 7 – Esquema do delineamento Experimental dos grupos vacinados C/V e E/V



Fonte: Honda, 2013.

4.3.9 Análise estatística

Os dados foram organizados para que fosse possível uma avaliação entre os grupos experimentais nos três pontos analisados. Os dados foram primeiramente avaliados pelo teste de Bartlett para determinação da homogeneidade das variâncias.

Nos dados paramétricos foi realizada 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 grupos. Foram consideradas significantes as análises com $P \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do peso relativo de Baço, Bursa de Fabricius e Fígado

As aves foram divididas ao acaso em quatro grupos. Foram realizadas as colheitas de baço, bursa e fígado nos dias 7, 14 e 19 de vida das aves.

5.1.1 Peso Relativo do Fígado

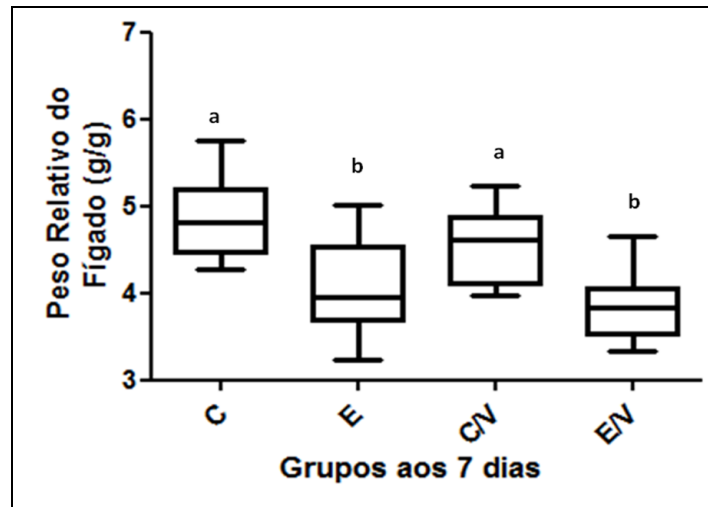
Aos 7 dias de vida, as aves dos grupos que receberam o estresse térmico por calor (E e E/V) mostraram redução do peso relativo do fígado, quando comparado dos grupos que foram mantidos em uma temperatura termonêutra (C e C/V) ($p < 0,05$). A figura 8 ilustra esse resultado.

Aos 14 dias de vida, observou-se que as aves dos grupos E/V e C/V apresentaram resultados de peso relativo de fígado maior que aquela dos animais do grupo C ($p < 0,05$), sendo que o peso relativo das aves do grupo E também apresentou uma tendência a ser maior que as do grupo C. Observa-se também que os grupos de aves vacinadas (C/V e E/V) mantiveram uma tendência de um peso relativo do fígado maior, quando comparado aos grupos que não receberam a vacina (C e E). Esses resultados são apresentados na figura 9.

Aos 19 dias de vida, como pode ser observado na figura 10, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos analisados ($p > 0,05$).

Os resultados referentes ao peso relativo do fígado dos animais podem ser observados na tabela 1.

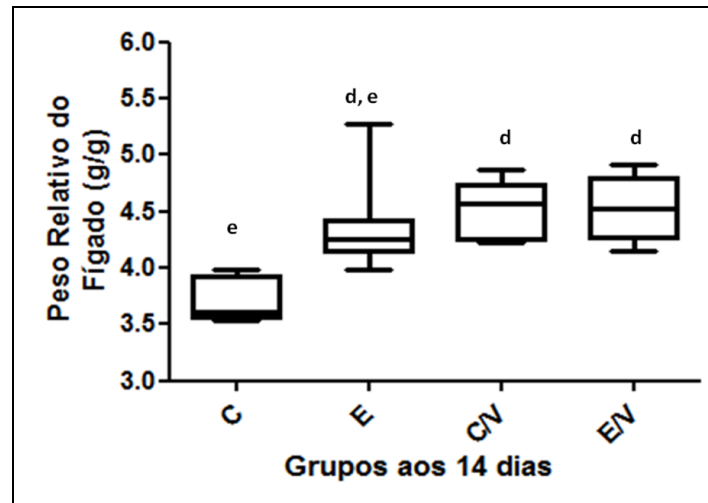
Figura 8 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre o peso relativo do fígado dos animais aos 7 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos dos pesos (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; ^{a, b} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com $P < 0,05$, ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$).

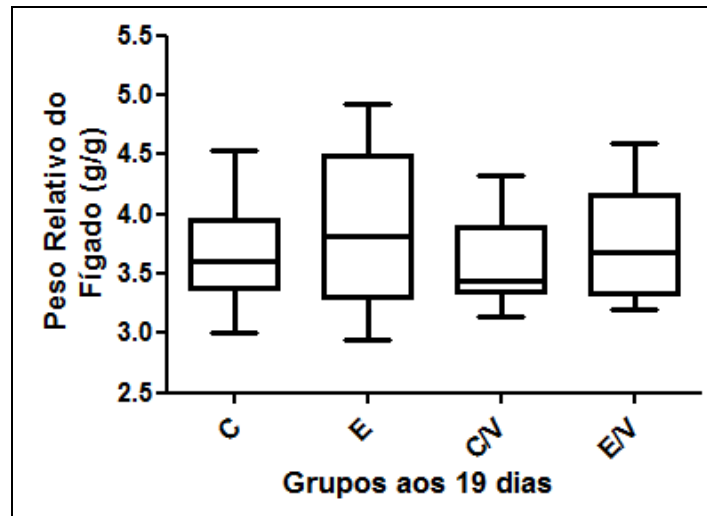
Figura 9 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre o peso relativo do fígado dos animais aos 14 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos dos pesos (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; ^{d, e} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com $P < 0,05$, Teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn para correção das comparações entre grupos ($P < 0,05$).

Figura 10 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre o peso relativo do fígado dos animais aos 19 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos dos pesos (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação.

Tabela 1 - Efeito dos diferentes tratamentos sobre as médias dos pesos relativos do fígado dos animais

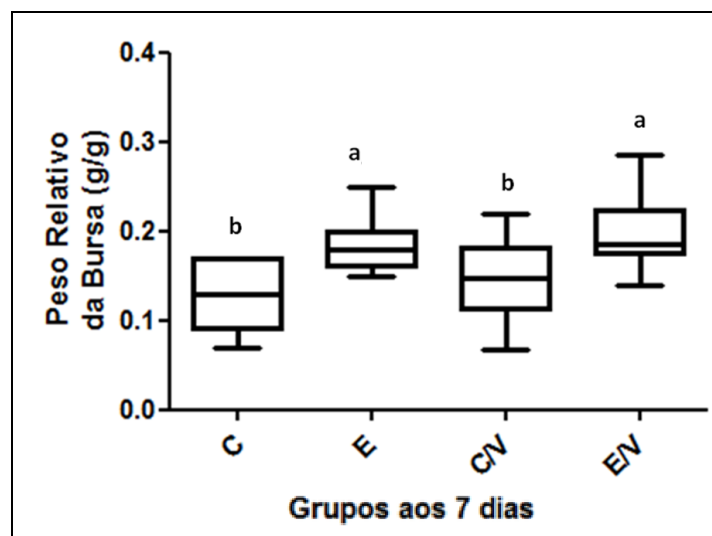
Grupo	Idade (dias)											
	7				14				19			
	C	E	C/V	E/V	C	E	C/V	E/V	C	E	C/V	E/V
Médias dos Pesos relativos do fígado (g/g)	4,83 a	4,05 b	4,54 a	3,84 b	3,72 e	4,37 d,e	4,53 d	4,52 d	3,66	3,88	3,57	3,76
Desvio Padrão	±0,50	±0,59	±0,44	±0,40	±0,19	±0,42	±0,25	±0,46	±0,44	±0,69	±0,36	±0,51

Nota: Os dados representam a média \pm desvios padrão dos pesos relativos do fígado dos animais nos diferentes grupos e dias analisados; C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; ^{a, b} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com $P < 0,05$, ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$); ^{d, e} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com $P < 0,05$, Teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn para correção das comparações entre grupos ($P < 0,05$).

5.1.2 Peso Relativo da Bursa de Fabricius

Como ilustrado na figura 11, aos 7 dias de vida, observou-se que as aves pertencentes aos grupos estressados por calor (E e E/V) apresentaram um peso relativo de bursa maior que aquele dos grupos mantidos em temperatura termonêutra (C e C/V) ($p < 0,05$). No entanto, essas diferenças não foram observadas aos dias 14 e 19 de vida das aves, conforme ilustram as figuras 12 e 13 respectivamente. Os resultados dos pesos relativos da bursa dos animais podem ser observados na tabela 2.

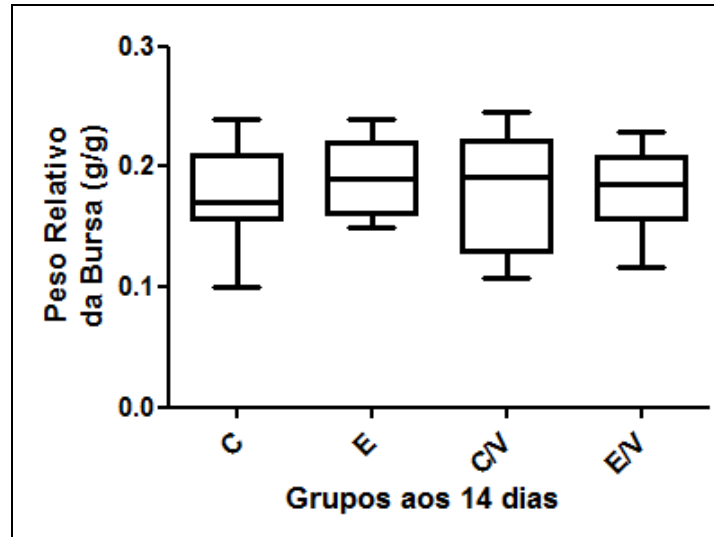
Figura 11 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre o peso relativo da bursa dos animais aos 7 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos dos pesos ($n=8$ /grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; ^{a, b} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com $P < 0,05$, ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$).

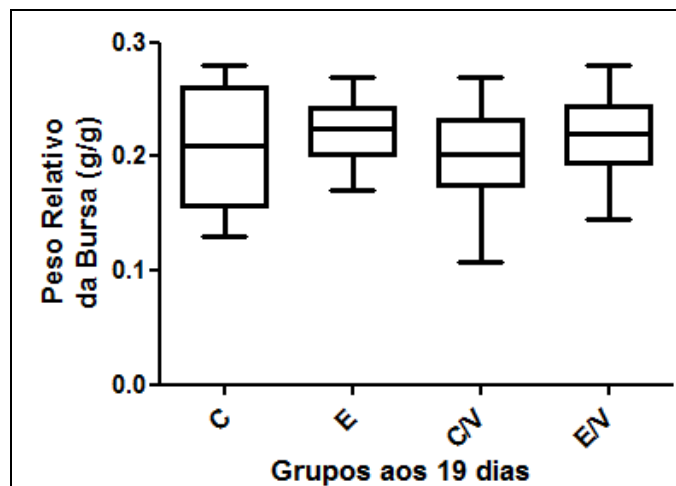
Figura 12 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre o peso relativo da bursa dos animais aos 14 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos dos pesos (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação.

Figura 13 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre o peso relativo da bursa dos animais aos 19 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos dos pesos (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação.

Tabela 2 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre as médias dos pesos relativos da bursa dos animais

Grupo	Idade (dias)											
	7				14				19			
	C	E	C/V	E/V	C	E	C/V	E/V	C	E	C/V	E/V
Médias dos Pesos relativos da Bursa (g/g)	0,13 b	0,18 b	0,14 b	0,19 a	0,17	0,18	0,18	0,18	0,20	0,22	0,19	0,21
Desvio Padrão	±0,39	±0,03	±0,04	±0,04	±0,04	±0,03	±0,04	±0,03	±0,05	±0,02	±0,04	±0,03

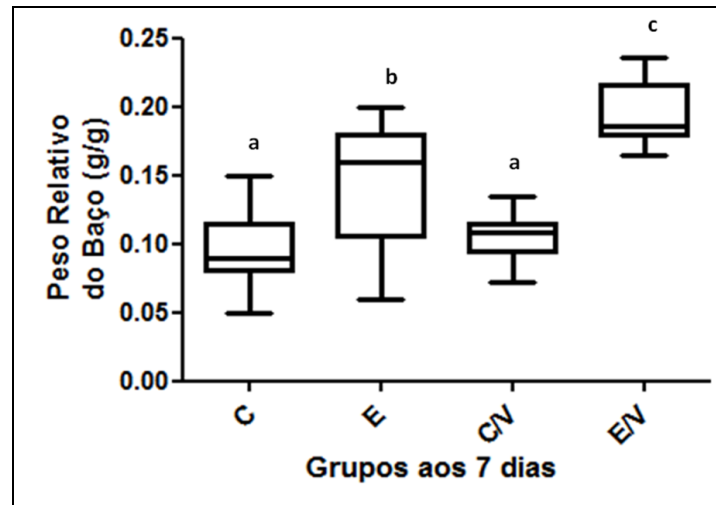
Nota: Os dados representam a média \pm desvios padrão dos pesos relativos da bursa dos animais nos diferentes grupos e dias analisados; C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; ^{a,b} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com $P < 0,05$, ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$).

5.1.3 Peso Relativo do Baço

Aos 7 dias de vida, observou-se que as aves pertencentes ao grupo que receberam o estresse térmico por calor (E e E/V) apresentaram um peso relativo de bursa maior que os animais dos grupos mantidos em temperatura termonêutra (C e C/V) ($p < 0,05$), como ilustrado na figura 14. No entanto, aos 14 e 19 dias de vida, essa diferença não foi mais observada, conforme ilustrado nas figuras 15 e 16 respectivamente.

Os resultados dos pesos relativos do baço dos animais podem ser observados na tabela 3.

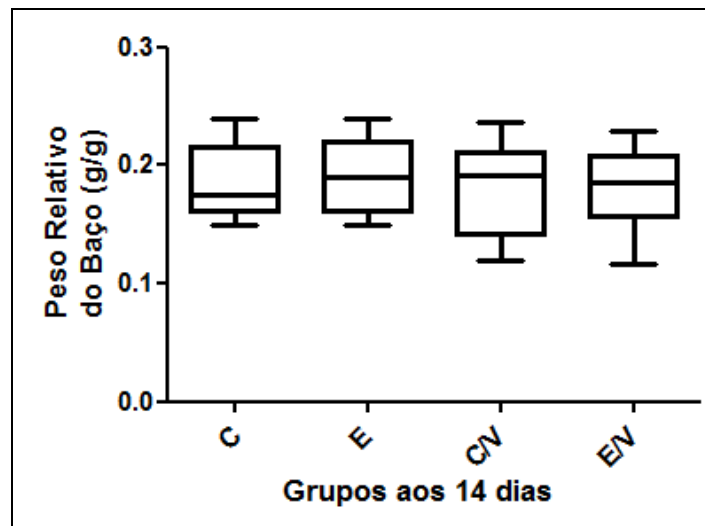
Figura 14 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre o peso relativo do baço dos animais aos 7 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos dos pesos (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; ^{a, b, c} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com $P < 0,05$, ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$).

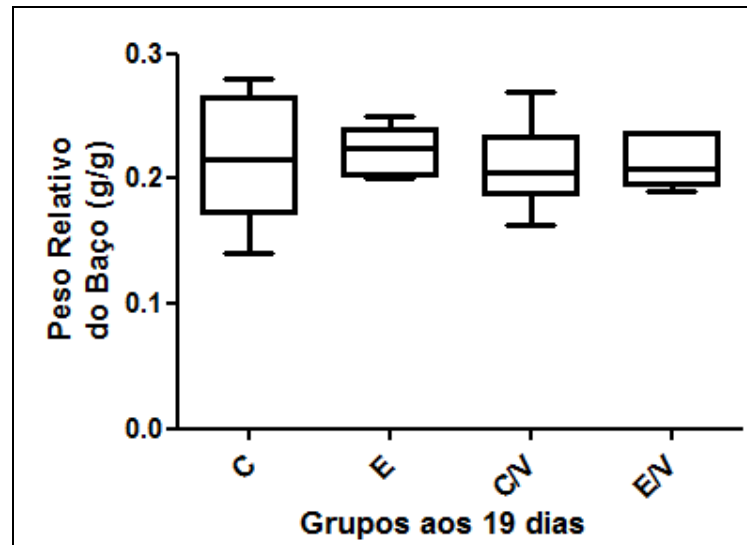
Figura 15 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre o peso relativo do baço dos animais aos 14 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos dos pesos (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação.

Figura 16 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre o peso relativo do baço dos animais aos 19 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos dos pesos (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação.

Tabela 3 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre as médias dos pesos relativos do baço dos animais

Grupo	Idade (dias)											
	7				14				19			
	C	E	C/V	E/V	C	E	C/V	E/V	C	E	C/V	E/V
Média dos Pesos relativos do Baço (g/g)	0,09 a	0,14 b	0,10 a	0,19 c	0,18	0,18	0,18	0,18	0,21	0,22	0,21	0,21
Desvio Padrão	±0,02	±0,04	±0,01	±0,02	±0,03	±0,03	±0,03	±0,03	±0,04	±0,01	±0,03	±0,02

Nota: Os dados representam a média \pm desvios padrão dos pesos relativos do baço dos animais nos diferentes grupos e dias analisados; C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; ^{a, b, c} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com $P < 0,05$, ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$).

5.2 Quantificação dos Níveis Séricos de Imunoglobulinas

Foram realizadas colheita de amostras de sangue periférico aos dias 7, 14 e 19 de vida. Em cada colheita, 8 animais de cada grupo foram retirados aleatoriamente para colheita de sangue e o soro foi utilizado para dosagem de IgM e IgY.

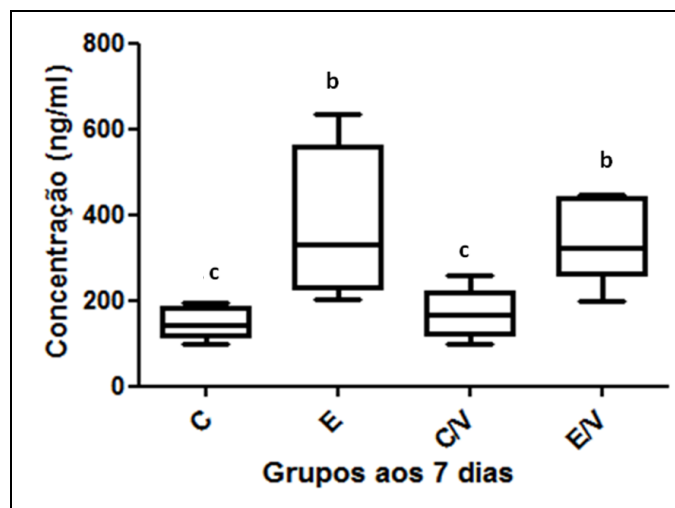
5.2.1 Quantificação Sérica de IgM

Conforme ilustrado pela figura 17, aos 7 dias de vida, as aves pertencentes aos grupos submetidos ao protocolo de estresse térmico por calor (E e E/V) apresentaram uma concentração sérica de IgM maior que aquela de aves mantidas à temperatura termonêutra (C e C/V) ($p>0,05$).

Aos 14 e 19 dias de vida das aves, observou-se a manutenção do padrão observado aos 7 dias, mas sem diferença estatística; as aves estressadas (E e E/V) apresentaram uma concentração maior de IgM quando comparadas às aves não estressadas (C e C/V), sendo essa diferença mais acentuada aos 19 dias. As figuras 18 e 19 ilustram esses resultados. Quando foi feita uma comparação dos resultados das aves dos grupos vacinados e não vacinados, não se observam diferenças estatísticas ($p>0,05$).

Os resultados das concentrações séricas de IgM no sangue periférico (ng/ml) dos animais podem ser observados na tabela 4.

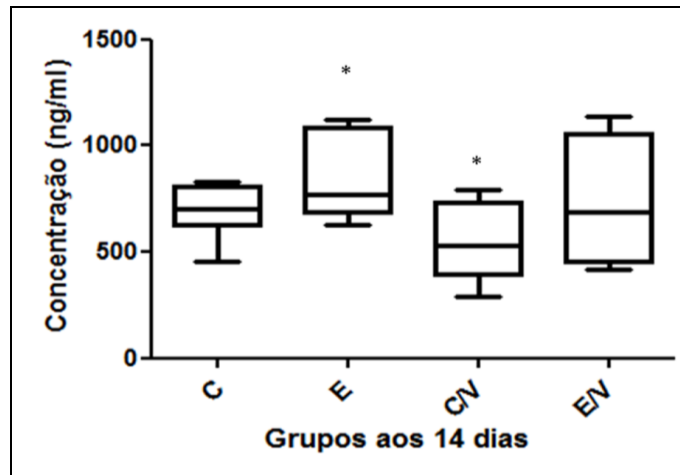
Figura 17 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a concentração sérica de IgM no sangue periférico dos animais aos 7 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos das concentrações de IgM em frangos de corte ($n=8$ /grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; ^{b,c} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com $P<0,05$, ANOVA e pós-teste de Tukey ($P<0,05$).

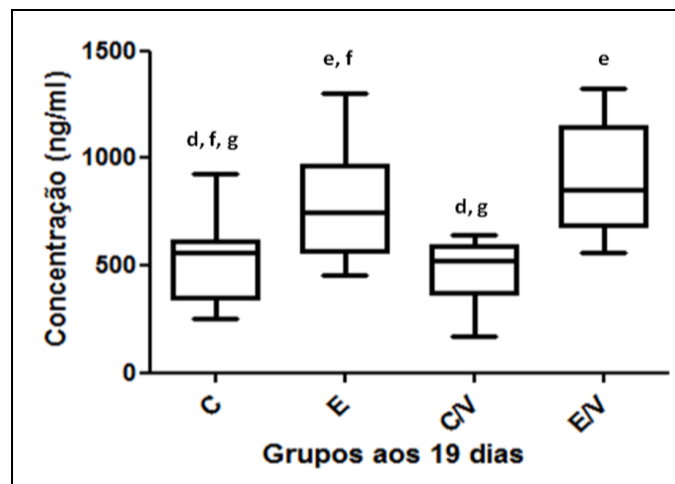
Figura 18 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a concentração sérica de IgM no sangue periférico dos animais aos 14 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos das concentrações de IgM em frangos de corte (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; *P<0,05, ANOVA e pós-teste de Tukey (P<0,05).

Figura 19 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a concentração sérica de IgM no sangue periférico dos animais aos 19 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos das concentrações de IgM em frangos de corte. (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; ^{d, e, f, g} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com P<0,05, ANOVA e pós-teste de Tukey (P<0,05),

Tabela 4 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre as médias das concentrações séricas de IgM no sangue periférico dos animais

Grupo	Idade (dias)											
	7				14				19			
	C	E	C/V	E/V	C	E	C/V	E/V	C	E	C/V	E/V
Média das Concentrações Séricas de IgM (ng/ml)	147,8 c	365,9 b	171,1 c	337,8 b	693,3	849,9 *	544,7 *	704,3	524 d,f,g	788,8 e,f	466 d,g	892,2 e
Desvio Padrão	±35,2	±171,0	±54,58	±91,72	±130,6	±202,3	±177,0	±295,5	±208,0	±285,7	±153,2	±251,0

Nota: Os dados representam a média ± desvios padrão da concentração sérica de IgM dos animais nos diferentes grupos e dias analisados; C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; ^{a, b, c} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com P<0,05, ANOVA e pós-teste de Tukey (P<0,05); *P<0,05, ANOVA e pós-teste de Tukey (P<0,05); ^{d, e, f, g} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com P<0,05, ANOVA e pós-teste de Tukey (P<0,05).

5.2.2 Quantificação Sérica de IgY

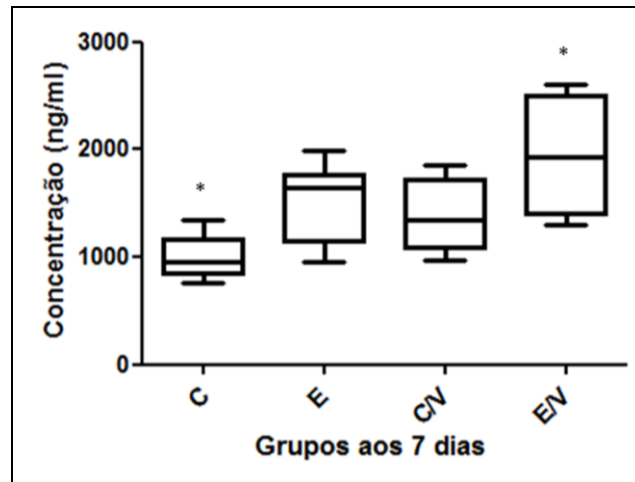
A figura 20 ilustra os achados; ela mostra que aos 7 dias de vida, há uma tendência de que as aves estressadas (E e E/V) apresentaram uma concentração sérica de IgY maior que aquela das aves mantidas à temperatura termonêutra (C e C/V).

Aos 14 dias de vida, também observamos uma tendência de que os grupos das aves vacinadas (C/V e E/V) apresentaram uma concentração séricas de IgY menor que as aves dos grupos não vacinados (C e E). Esses resultados são ilustrados pela figura 21.

Aos 19 dias de vida, observou-se mais uma vez uma tendência de que as aves dos grupos vacinados (C/V e E/V) apresentaram uma concentração menor de IgY no soro quando comparadas às aves dos grupos não vacinados (C e E). No entanto, o grupo E/V apresentaram concentrações de IgY menores que aquelas do respectivo grupo controle C/V. Esses resultados estão ilustrados na figura 22.

Os resultados das concentrações séricas de IgY no sangue periférico (ng/ml) dos animais podem ser observados na tabela 5.

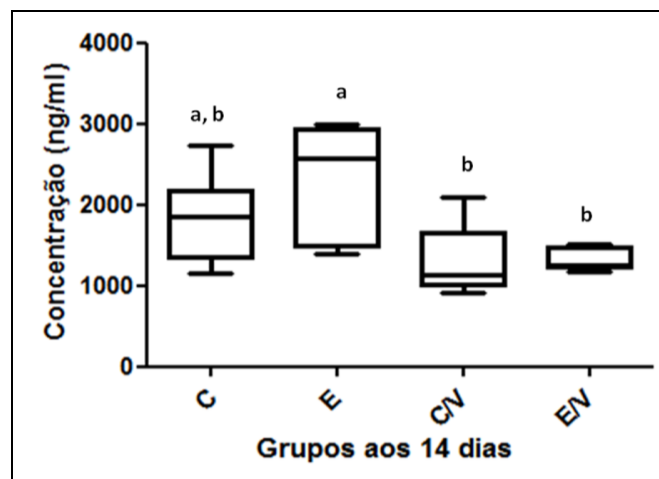
Figura 20 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a concentração sérica de IgY no sangue periférico dos animais aos 7 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos das concentrações de IgY em frangos de corte (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; * P<0,05, Teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn para correção das comparações entre grupos.

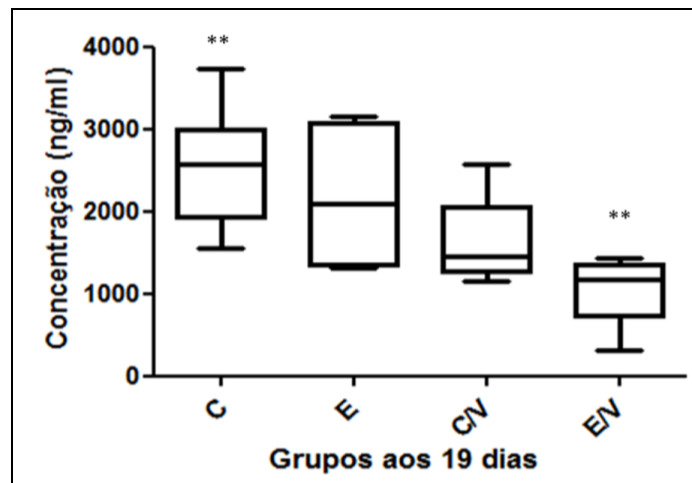
Figura 21 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a concentração sérica de IgY no sangue periférico dos animais aos 14 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos das concentrações de IgY em frangos de corte (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; ^{a, b} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com P<0,05, ANOVA e pós-teste de Tukey (P<0,05).

Figura 22 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a concentração sérica de IgY no sangue periférico dos animais aos 19 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos das concentrações de IgY em frangos de corte (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; **P<0,05, ANOVA e pós-teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 5 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre as médias das concentrações séricas de IgY no sangue periférico dos animais.

Grupo	Idade (dias)											
	7				14				19			
	C	E	C/V	E/V	C	E	C/V	E/V	C	E	C/V	E/V
Média das Concentrações Séricas de IgY (ng/ml)	994,7 *	1516	1388	1939 *	1888 a,b	2272 a	1321 b	1313 b	2544 **	2169	1635	1049 **
Desvio Padrão	±196,2	±374,2	±355,6	±579,6	±534,2	±752,9	±404,2	±137,4	±702,5	±947,9	±518,2	±408,5

Nota: Os dados representam a média ± desvios padrão da concentração sérica de IgY dos animais nos diferentes grupos e dias analisados; C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; * P<0,05, Teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn para correção das comparações entre grupos; ^{a, b} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com P<0,05, ANOVA e pós-teste de Tukey (P<0,05); **P<0,05, ANOVA e pós-teste de Tukey (P<0,05).

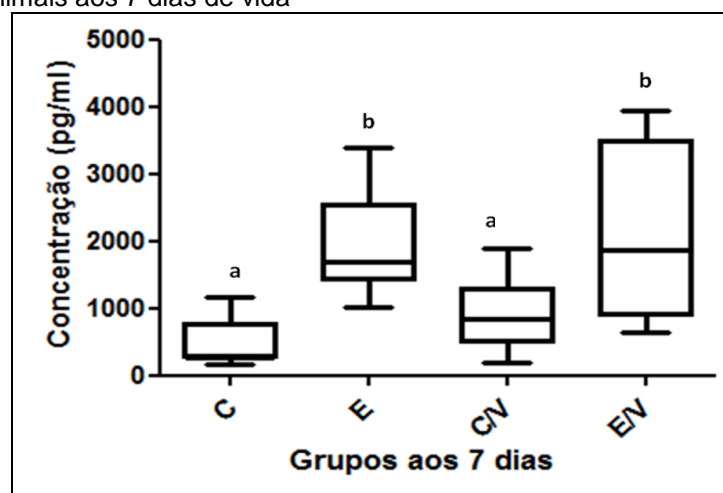
5.3 Quantificação dos Níveis Séricos de Corticosterona

Foram realizadas colheitas de sangue nos dias 7, 14 e 19 de vida. Em cada momento, 8 animais de cada grupo foram retirados aleatoriamente para colheita de sangue e o soro foi utilizado para dosagem de corticosterona.

Como ilustrado na figura 23, aos 7 dias de vida observou-se que as aves estressadas (E e E/V) apresentaram uma concentração sérica de corticosterona maior que aquela medida nos animais dos grupos mantidos em temperatura termonêutra (C e C/V) ($p > 0,05$). Porém, aos 14 e 19 dias de vida essa diferença não foi mais observada ($p > 0,05$), conforme ilustrado pelas figuras 24 e 25, respectivamente.

Os resultados dos níveis séricos de corticosterona (pg/ml) dos animais podem ser observados na tabela 6.

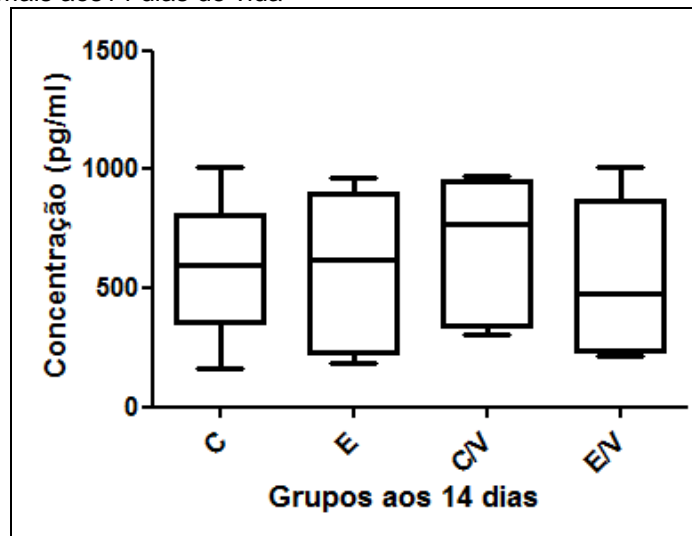
Figura 23 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a concentração sérica de corticosterona dos animais aos 7 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos das concentrações de corticosterona em frangos de corte (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; ^{a, b} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com $P < 0,05$, ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$).

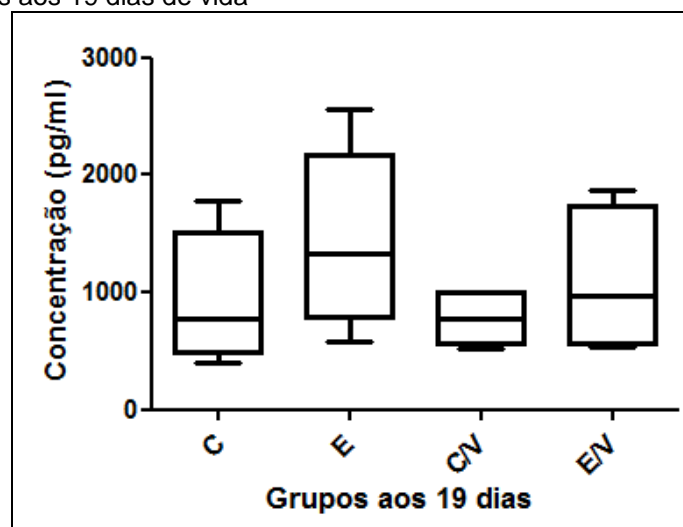
Figura 24 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a concentração sérica de corticosterona dos animais aos 14 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos das concentrações de corticosterona em frangos de corte (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação.

Figura 25 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a concentração sérica de corticosterona dos animais aos 19 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos das concentrações de corticosterona em frangos de corte (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação.

Tabela 6 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a média de corticosterona sérica no sangue periférico dos animais.

Grupo	Idade (dias)											
	7				14				19			
	C	E	C/V	E/V	C	E	C/V	E/V	C	E	C/V	E/V
Concentração sérica de Corticosterona (pg/ml)	518,7 a	1890 b	911,9 a	2103 b	588,1	569,9	666,4	553,2	946,3	1440	773,3	1083
Desvio Padrão	±375,6	±812,1	±537,3	±1367	±289,7	±343,1	±313,9	±302,4	±562,6	±764,1	±239,8	±629,4

Nota: Os dados representam a média \pm desvios padrão da concentração sérica de corticosterona dos animais nos diferentes grupos e dias analisados; C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; ^{a, b} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com $P < 0,05$, ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$).

5.4 Avaliação das Populações de Linfócitos B e T de Sangue Periférico

Foram realizadas colheitas de amostras de sangue periférico nos dias 7, 14 e 19 de vida da ave. Em cada momento, 8 animais de cada grupo foram retirados aleatoriamente para colheita de sangue para imunofenotipagem de linfócitos B e T (CD3, CD4 e CD8), sendo esta realizada por meio da citometria de fluxo.

5.4.1 Linfócito B (anti-Bu1-PE)

Como ilustrado na figura 26, aos 7 dias de vida, as aves dos grupos E/V e E apresentaram uma tendência a uma porcentagem de linfócitos B menor em sangue periférico que aqueles dos animais dos grupos C e C/V.

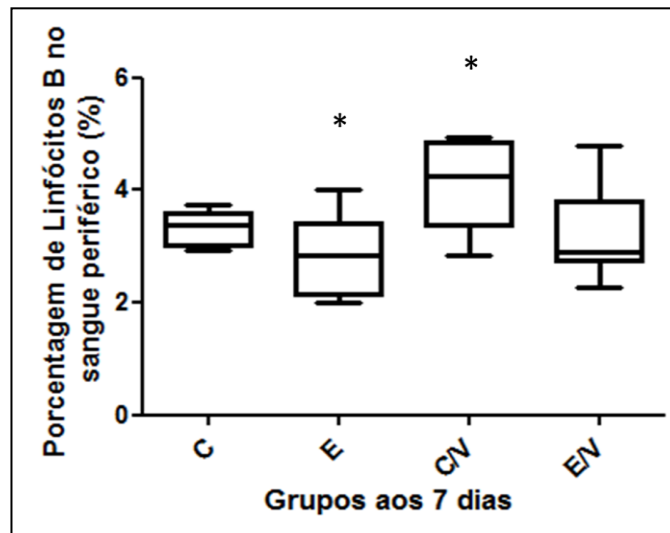
A figura 27 mostra que aos 14 dias as aves do grupo C/V apresentaram uma porcentagem de linfócitos B maior do que aquela dos animais do grupo E/V ($p > 0,05$). As aves do grupo controle (C), por não possuírem nenhum desafio imunológico, mantiveram a porcentagem de linfócitos B em um nível basal.

Aos 19 dias de vida, observou-se o mesmo panorama encontrado aos 14 dias, no qual as aves do grupo C/V apresentaram uma porcentagem de linfócitos B maior aquela do grupo C ($p > 0,05$). As aves do grupo controle mantiveram a

porcentagem de linfócitos B em um nível basal. A influência do estresse na população em questão foi também observada nessa idade, isto é, mesmo 2 semanas depois do estímulo estressor. Porém, não se observaram diferenças estatísticas entre os resultados dos grupos E, C/V e E/V, apesar das aves do grupo C/V em apresentarem maior população de linfócitos B que aquela medida nas aves dos demais grupos. A figura 28 ilustra esses resultados.

Os resultados de porcentagem de Linfócitos B no sangue periférico dos animais podem ser observados na tabela 7.

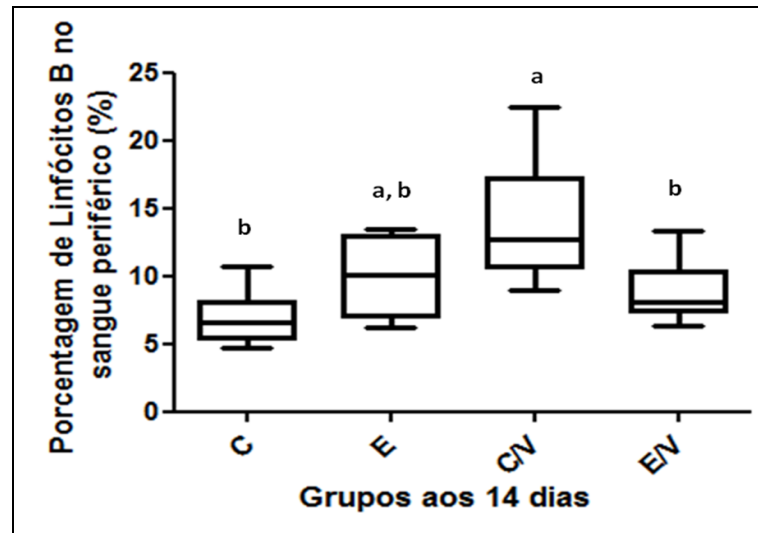
Figura 26 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porcentagem de linfócitos B no sangue periférico dos animais aos 7 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos das porcentagens de linfócitos B no sangue periférico de frangos de corte (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; * P<0,05, ANOVA e pós-teste de Tukey (P<0,05).

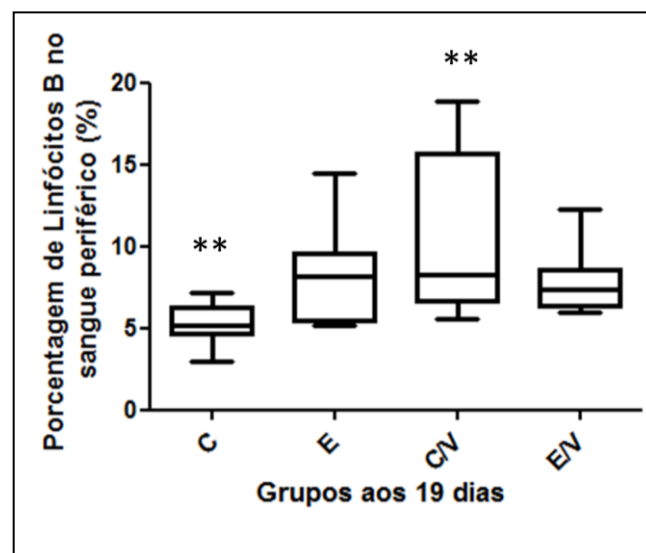
Figura 27 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porcentagem de linfócitos B no sangue periférico dos animais aos 14 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos das porcentagens de linfócitos B no sangue periférico de frangos de corte (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; ^{a, b, c} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com $P < 0,05$, ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$).

Figura 28 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porcentagem de linfócitos B no sangue periférico dos animais aos 19 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos das porcentagens de linfócitos B no sangue periférico de frangos de corte (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; ** $P < 0,05$, Teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn para correção das comparações entre grupos ($P < 0,05$).

Tabela 7 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a média de porcentagem de Linfócitos B no sangue periférico

Grupo	Idade (dias)											
	7				14				19			
	C	E	C/V	E/V	C	E	C/V	E/V	C	E	C/V	E/V
Porcentagem de Linfócitos B no sangue periférico (%)	3,30	2,78*	4,13*	3,19	6,90 b	10,08 a,b	13,89 a	8,82 b	5,31**	8,15	10,62**	7,74
Desvio Padrão	± 0,32	± 0,73	± 0,83	± 0,86	± 1,93	± 2,90	± 4,54	± 2,23	± 1,36	± 3,33	± 5,13	± 1,98

Nota: Os dados representam a média \pm desvios padrão das porcentagens de Linfócitos B do sangue periférico dos animais nos diferentes grupos e dias analisados; C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; * $P < 0,05$ ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$); ^{a, b} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com $P < 0,05$, ANOVA e pós-teste de Tukey; ** $P < 0,05$, Teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn para correção das comparações entre grupos ($P < 0,05$).

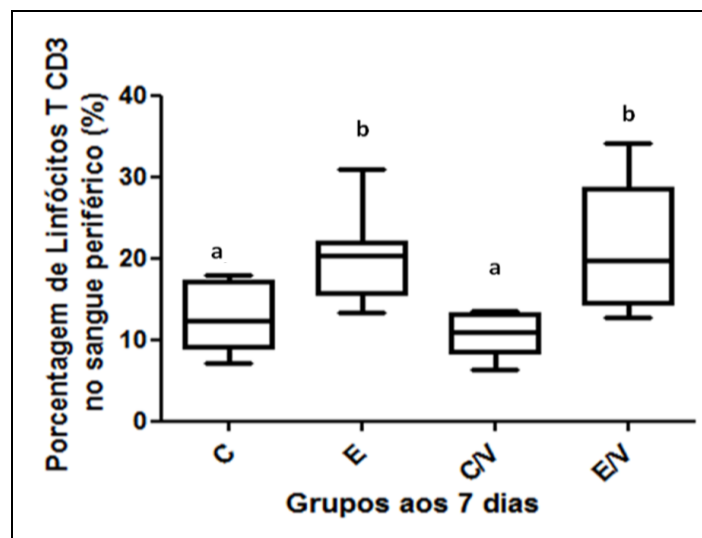
5.4.2 Linfócitos T Totais (anti-CD3-FITC)

A figura 29 ilustra os resultados aos 7 dias de vida, sendo que as aves do grupo E/V e E apresentaram uma porcentagem de linfócitos T em sangue periférico maior do que aquela medida nos grupos C e C/V ($p > 0,05$). Porém, quando da análise dos dados referentes aos 14 dias de vida, não observamos diferenças estatísticas entre os grupos (Figura 30).

A figura 31 mostra que aos 19 dias de vida, os animais dos grupos vacinados apresentaram uma porcentagem de linfócitos T circulantes menor que aquela observada nos animais dos grupos não vacinados.

Os resultados de porcentagem de Linfócitos T totais no sangue periférico dos animais podem ser observados na tabela 8.

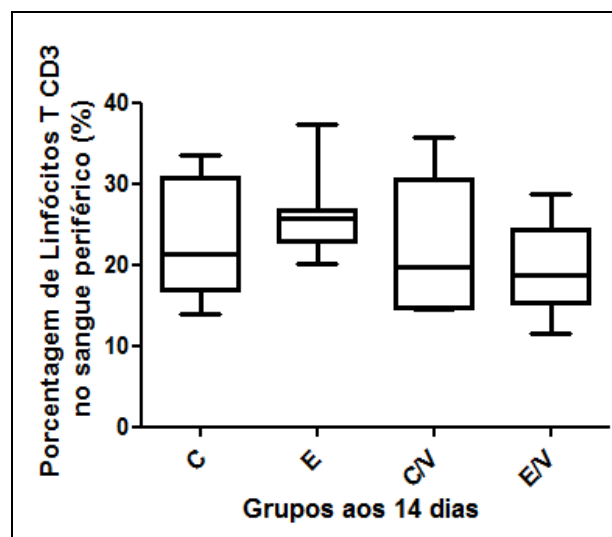
Figura 29 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porcentagem de linfócitos T no sangue periférico dos animais aos 7 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos das porcentagens de linfócitos T no sangue periférico de frangos de corte (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; ^{a,b} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com $P < 0,05$ ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$).

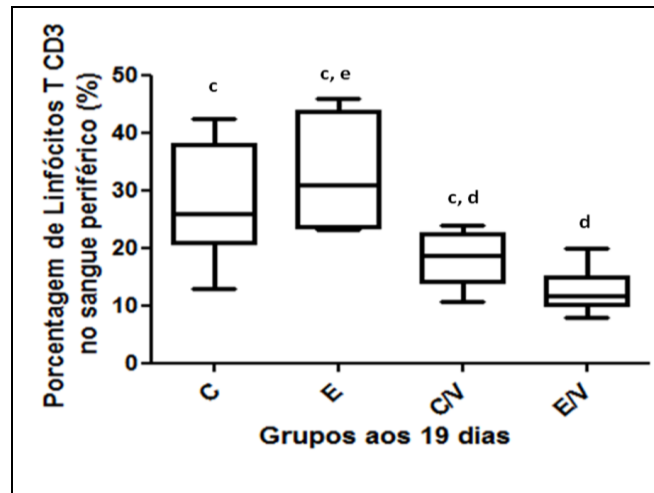
Figura 30 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porcentagem de linfócitos T no sangue periférico dos animais aos 14 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos das porcentagens de linfócitos T no sangue periférico de frangos de corte (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação.

Figura 31 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porcentagem de linfócitos T no sangue periférico dos animais aos 19 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos das porcentagens de linfócitos T no sangue periférico de frangos de corte (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; ^{c,d,e} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com $P < 0,05$, ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 8 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a média de porcentagem de Linfócitos T no sangue periférico

Grupo	Idade (dias)											
	7				14				19			
	C	E	C/V	E/V	C	E	C/V	E/V	C	E	C/V	E/V
Porcentagem de Linfócitos T no sangue periférico (%)	12,88 a	20,20 b	10,57 a	21,32 b	23,53	26,04	21,98	19,28	27,78 c	32,85 c,e	18,14 c, d	12,51 d
Desvio Padrão	±4,31	±5,64	±2,63	±8,40	±7,39	±5,55	±8,49	±5,92	±10,38	±9,85	±4,58	±3,69

Nota: Os dados representam a média \pm desvios padrão das porcentagens de Linfócitos T totais do sangue periférico dos animais nos diferentes grupos e dias analisados; C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; ^{a,b} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com $P < 0,05$ ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$); ^{c,d,e} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com $P < 0,05$ ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$).

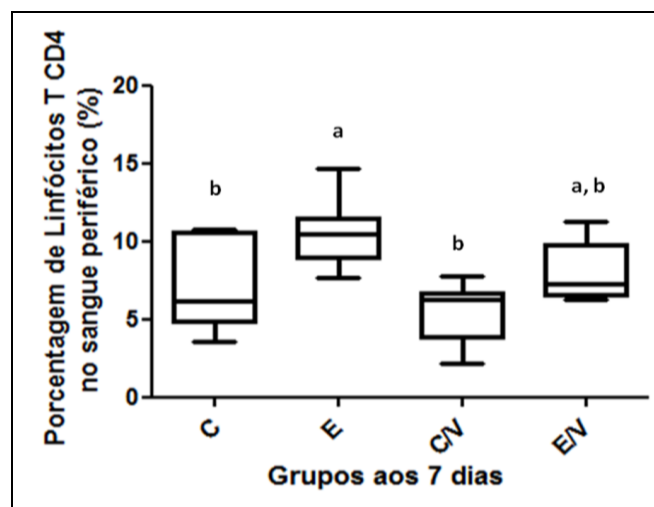
5.4.3 Linfócitos T auxiliares (anti-CD4-PE)

A figura 32 mostra que aos 7 dias de vida as aves do grupo E apresentaram uma porcentagem de linfócitos T auxiliares no sangue periférico maior que aquela das aves dos grupos não estressados ($p > 0,05$).

Uma semana após a primeira dose da vacina para a Doença de Newcastle (14 dias), as aves vacinadas (C/V e E/V) apresentaram uma porcentagem menor de linfócitos T auxiliares em relação às aves não vacinadas (C e E) ($p > 0,05$), conforme ilustrado na figura 33. Já aos 19 dias, observou-se manutenção do perfil analisado aos 14 dias, indicando este fato que a redução da porcentagem de linfócitos T auxiliares nos grupos vacinados (C/V e E/V) foi mantida mesmo 2 semanas após a primeira dose e 1 semana após a segunda dose da vacina, conforme ilustrado na figura 34.

Os resultados de porcentagem de Linfócitos T auxiliares no sangue periférico dos animais podem ser observados na tabela 9.

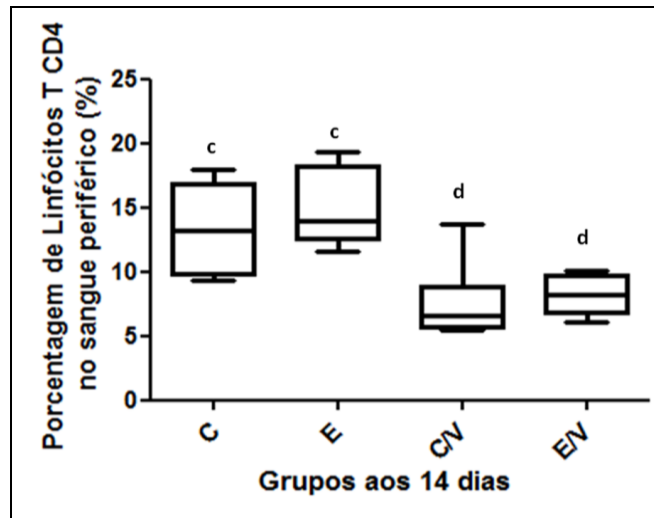
Figura 32 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porcentagem de linfócitos T auxiliares no sangue periférico dos animais aos 7 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos das porcentagens de linfócitos T auxiliares no sangue periférico de frangos de corte ($n=8$ /grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; ^{a,b} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com $P < 0,05$ ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$).

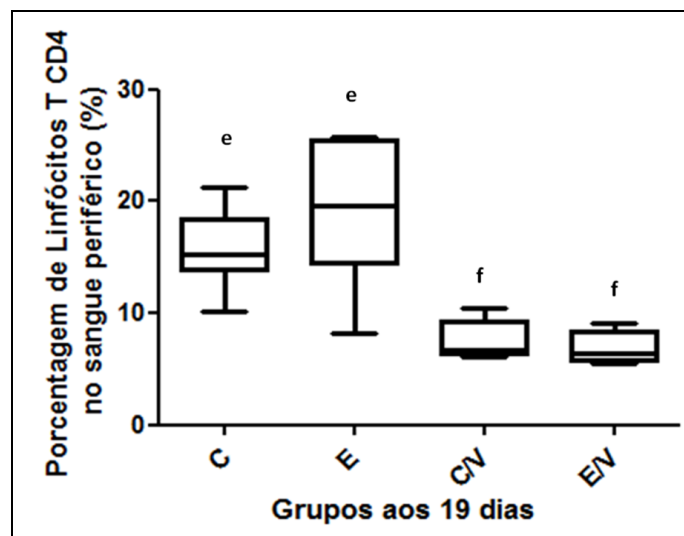
Figura 33 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porcentagem de linfócitos T auxiliares no sangue periférico dos animais aos 14 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos das porcentagens de linfócitos T auxiliares no sangue periférico de frangos de corte (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; ^{c,d} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com $P < 0,05$ Teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn para correção das comparações entre grupos ($P < 0,05$).

Figura 34 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porcentagem de linfócitos T auxiliares no sangue periférico dos animais aos 19 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos das porcentagens de linfócitos T auxiliares no sangue periférico de frangos de corte (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; ^{e,f} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com $P < 0,05$ Teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn para correção das comparações entre grupos ($P < 0,05$).

Tabela 9 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a média de porcentagem de Linfócitos T auxiliares no sangue periférico

Grupo	Idade (dias)											
	7				14				19			
	C	E	C/V	E/V	C	E	C/V	E/V	C	E	C/V	E/V
Porcentagem de Linfócitos T auxiliares no sangue periférico (%)	7,06 b	10,57 a	5,56 b	8,00 a,b	13,33 c	14,99 c	7,46 d	8,24 d	15,70 e	19,16 e	7,43 f	6,88 f
Desvio Padrão	±3,01	±2,12	±1,91	±1,95	±3,46	±3,04	±2,86	±1,57	±3,65	±6,78	±1,66	±1,39

Nota: Os dados representam a média \pm desvios padrão das porcentagens de Linfócitos T auxiliares do sangue periférico dos animais nos diferentes grupos e dias analisados; C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; ^{a,b} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com $P < 0,05$ ANOVA e pós-teste de Tukey ($P < 0,05$); ^{c,d} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com $P < 0,05$ Teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn para correção das comparações entre grupos ($P < 0,05$); e ^{e, f} índices diferentes indicam diferença estatística entre os dados com $P < 0,05$ Teste de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Dunn para correção das comparações entre grupos ($P < 0,05$).

5.4.4 Linfócitos T citotóxicos (anti-CD8-PE)

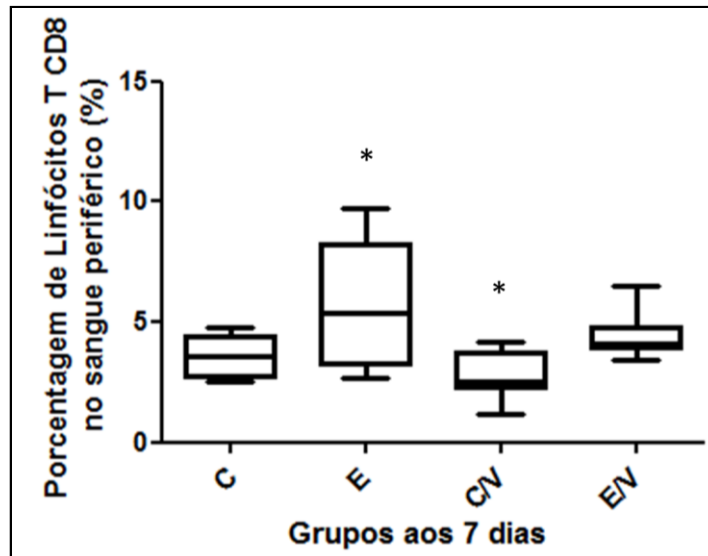
Como ilustrado na figura 35, aos 7 dias de vida as aves do grupo E apresentaram uma porcentagem de linfócitos T citotóxicos no sangue periférico maior que aquela do grupo C/V ($p > 0,05$).

Aos 14 dias, isto é, uma semana após a primeira dose da vacina para a Doença de Newcastle, observou-se que as aves do grupo C/V apresentaram uma porcentagem menor de linfócitos T citotóxicos que aquela medida nos animais do grupo C/V ($p > 0,05$), conforme ilustrado na figura 36. A associação da vacinação com o estresse térmico por calor (E/V) resultou em uma maior porcentagem de linfócitos T citotóxicos nas aves do que aquelas aves do grupo C/V ($p > 0,05$).

Como ilustrado na figura 37, aos 19 dias de vida, ou seja, duas semanas após a vacina, não se observaram diferenças estatísticas entre os grupos analisados. No entanto, observou-se uma tendência de diminuição da porcentagem de linfócitos nas aves dos grupos vacinados (C/V e E/V) com relação as aves não vacinadas (C e E), fato este diferente do que havia sido observado aos 7 e 14 dias de vida .

Os resultados de porcentagem de Linfócitos T citotóxicos no sangue periférico dos animais podem ser observados na tabela 10.

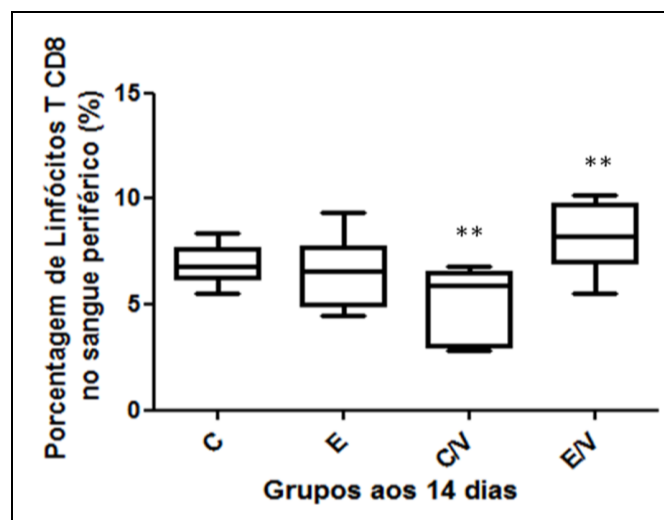
Figura 35 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porcentagem de linfócitos T citotóxicos no sangue periférico dos animais aos 7 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos das porcentagens de linfócitos T citotóxicos no sangue periférico de frangos de corte (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; * P<0,05 ANOVA e pós-teste de Tukey (P<0,05).

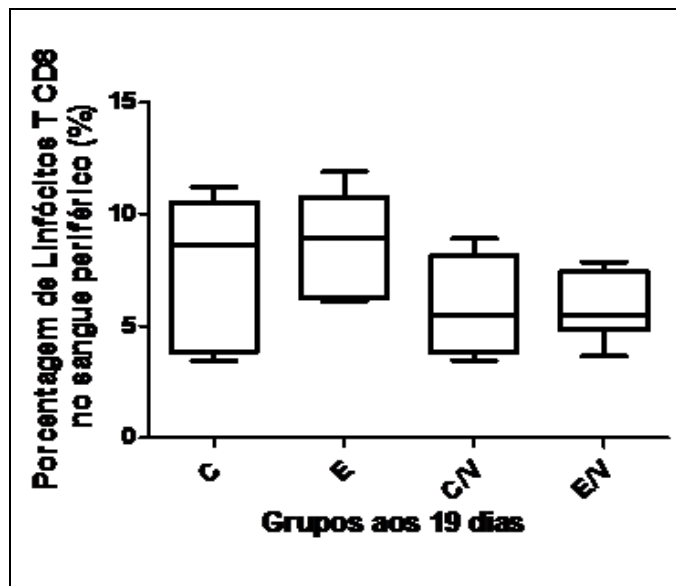
Figura 36 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porcentagem de linfócitos T citotóxico no sangue periférico dos animais aos 14 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos das porcentagens de linfócitos T citotóxicos no sangue periférico de frangos de corte (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; ** P<0,05 ANOVA e pós-teste de Tukey (P<0,05).

Figura 37 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porcentagem de linfócitos T citotóxicos no sangue periférico dos animais aos 19 dias de vida



Fonte: Honda, 2013.

Legenda: Boxplots com valores máximos e mínimos das porcentagens de linfócitos T citotóxicos no sangue periférico de frangos de corte (n=8/grupo); C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação.

Tabela 10 – Efeito dos diferentes tratamentos sobre a média de porcentagem de Linfócitos T citotóxicos no sangue periférico

Grupo	Idade (dias)											
	7				14				19			
	C	E	C/V	E/V	C	E	C/V	E/V	C	E	C/V	E/V
Porcentagem de Linfócitos T citotóxicos no sangue periférico (%)	3,54	5,64*	2,80*	4,40	6,86	6,56	5,14**	8,21**	7,42	8,57	5,86	5,82
Desvio Padrão	±0,92	±2,58	±0,98	±0,94	±0,93	±1,62	±1,76	±1,62	±3,20	±2,04	±2,11	±1,45

Nota: Os dados representam a média \pm desvios padrão das porcentagens de Linfócitos T citotóxicos do sangue periférico dos diferentes grupos e dias analisados; C: grupo controle sem vacinação; E: grupo estressado sem vacinação; C/V: grupo controle com vacinação; E/V: grupo estressado com vacinação; * P<0,05 ANOVA e pós-teste de Tukey (P<0,05); ** P<0,05 ANOVA e pós-teste de Tukey (P<0,05); **P=0,0120 ANOVA e pós-teste de Tukey (P<0,05).

6 DISCUSSÃO

Existem consideráveis evidências na literatura sobre os efeitos do estresse no sistema imune de mamíferos e de aves; mais especificamente, relacionados à imunossupressão, com conseqüente falha no desenvolvimento da resposta imune frente a desafios vacinais, ambientais e microbiológicos (WILDER, 1995; JOHNSON, 1998; ALVES; PALERMO-NETO, 2007; SHANIKO SHINI, KAISER, SHINI; BRYDEN, 2008; COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010; KAISER, 2010; KOKAIA, MARTINO, SCHWARTZ; LINDVALL, 2012).

O presente trabalho dá continuidade à linha de pesquisa do grupo de pesquisa FAPESP em neuroimunomodulação, analisando, desta forma, os efeitos do estresse sobre características de imunidade adquirida em frangos de corte vacinados. Observamos que o estresse por calor ($38\pm 2^{\circ}\text{C}$) aplicado na primeira semana de vida dos frangos de corte reduziu o peso relativo do fígado e aumentou aqueles do baço e da bursa, além de aumentar as concentrações séricas de IgY e IgM. Observamos, ainda, que o estresse por calor alterou o perfil de células do SI das aves vacinadas de linfócitos B para T citotóxicos e auxiliares.

Sabe-se que o SNC e o SI estão intimamente ligados, podendo o SNC exercer efeitos sobre o SI a partir da ativação, entre outros, do eixo HHA (GROSS; SIEGEL, 1983; MUMMA et al., 2006; SHINI et al., 2010). Precisamente, esta ligação ocorre através da secreção e ação de hormônios hipotalâmicos e hipofisários como o CRH, ACTH e GC. Outra via relevante de interação é representada pela inervação simpática dos órgãos linfoides e células imunes (WRONA et al., 2005). A comunicação existente entre o SNC e SI se faz, principalmente, através de citocinas, quimiocinas e hormônios (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996; ELENKOV; CHROUSOS, 1999). Quando os níveis destes hormônios se mantêm elevados, em especial, por longos períodos de tempo, há prejuízos à saúde dos animais. (CALCAGNI; ELENKOV, 2006; ALVES; PALERMO-NETO, 2007; RIBEIRO et al., 2009; QUINTEIRO-FILHO et al., 2010).

Em nossos achados, observamos um aumento dos níveis séricos de corticosterona nas aves que foram submetidas ao estímulo estressor (calor a $38\pm 2^{\circ}\text{C}$). Estes dados concordam com os outros advindos de trabalhos

desenvolvidos em nossos laboratórios (QUINTEIRO-FILHO et al., 2010) ou em outros laboratórios (ELENKOV et al., 2000; CALCAGNI; ELENKOV, 2006; SHINI et al., 2010). Neste sentido, torna-se relevante salientar que a vacinação pela via ocular nas aves não aumentou *per se* os níveis de corticosterona sérica, indicando este achado que o procedimento da vacinação não ativou o eixo HHA e, conseqüentemente, não foi estressante para as aves.

Em nossos laboratórios, Quinteiro-Filho et al. (2010) observaram que o estresse térmico por calor aplicado de forma crônica ($31\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 10h/dia) na última semana de vida do frango de corte antes do abate (do 35^o ao 42 dias de vida), aumentou os níveis de corticosterona, reduziu os parâmetros de desempenho (ganho de peso vivo e consumo de ração), e foi associado à ocorrência de enterite multifocal caracterizada pela presença de linfócitos e plasmócitos na lâmina própria do jejuno, sendo possível relacionar esses achados à ativação do eixo HHA. Além disso, observou-se uma redução do peso relativo de órgãos linfoides e da atividade de macrófagos peritoneais. Em outro trabalho também desenvolvido em nossos laboratórios por Quinteiro-Filho et al. (2012), as aves foram submetidas a um protocolo de estresse térmico por calor aplicado de forma aguda ($31\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 10h no dia 35 de vida das aves). De forma semelhante ao protocolo anteriormente citado, também se observou aumento da concentração de corticosterona e redução do consumo de ração e do ganho de peso.

No presente trabalho foi realizada a avaliação do peso relativo dos órgãos linfoides visando identificar se o estresse aplicado na forma crônica, desta vez na primeira semana de vida das aves, seria capaz de modular este parâmetro; nesta idade as aves ainda se encontram no processo de desenvolvimento e maturação dos órgãos linfoides e do SI (ZULKIFLIA et al., 1994).

Dentre os órgãos avaliados, o fígado possui singular importância. Trata-se de um órgão de circulação dupla que recebe sangue proveniente da circulação sistêmica, via veia porta-hepática, através de sinusoides por uma população de macrófagos residentes denominados células de Kupffer. A exposição das células contidas no fígado a diferentes antígenos e produtos microbianos derivados de bactérias intestinais, resulta em um ambiente imune distinto. Células NK e linfócitos T encontram-se em abundância no fígado. Além disso, várias populações de células hepáticas de origem não hematopoiética (células endoteliais e parenquimais, por

exemplo) também desempenham no fígado função de células apresentadoras de antígeno. Trata-se de um importante sítio primário de ativação de células T. Em nosso trabalho, observamos que o estresse reduziu o peso relativo do fígado aos 7 dias de vida, quando comparado às aves que foram mantidas em temperatura termonêutra. De forma semelhante, Zeferino et al., (2013) avaliaram o peso relativo dos órgãos metabolicamente ativos para a determinação da melhor temperatura ambiente para o desenvolvimento de uma melhor qualidade de carne em coelhos, e observaram uma redução do peso relativo do fígado dos coelhos submetidos ao estresse térmico. Givisiez et al. (2001) também observaram que o estresse térmico em embriões de frangos induziu uma redução do peso relativo tanto do fígado como do coração. Clark and Das (1974) observaram um fígado visualmente menor em aves estressadas mantidas a temperaturas de até 38°C. Esses autores também observaram, quando da análise histopatológica do fígado, áreas de degeneração do parênquima, degeneração lipídica, congestão dos vasos hepáticos, degeneração nuclear, infiltrado leucocítico e áreas de necrose focal.

A partir do exposto, três hipóteses podem ser formuladas com relação ao efeito imediato do estresse sobre o peso do relativo do fígado das aves de nosso trabalho: 1) houve um retardo no processo de desenvolvimento/maturação do órgão; 2) houve uma degeneração do órgão, à semelhança do que foi observado por Clark e Das (1974); ou 3) ocorreu uma modulação do metabolismo energético das aves de forma responsiva àquela que ocorre quando do estresse, isto é, redução do metabolismo em resposta à redução do consumo de ração (PLAVNIK; YAHAV, 1998; TAYLOR et al., 2010). Os dados obtidos em nosso trabalho não permitem a escolha de uma das hipóteses citadas, tornando-se necessários estudos suplementares do desenvolvimento dos órgãos linfoides das aves na primeira semana de vida, quando influenciados ou não pelo estresse térmico por calor.

Uma semana após a primeira dose da vacina para a DN (cepa La Sota), ou seja, aos 14 dias de vida, observamos que o peso relativo do fígado foi maior nas aves pertencentes aos grupos C/V e E/V. Este fato pode ser associado ao processo de viremia do vDN, mais especificamente na excreção viral, como descrito por Rwuaan, Rekwot e Omontese (2012), que avaliaram os efeitos de uma cepa velogênica de vDN no peso dos órgãos de frangos de corte, observando que as aves desafiadas apresentaram um fígado de maior tamanho. Além disso, Njagi et al.

(2012), isolaram o vDN no fígado e rins de patos vacinados, relacionando esse fato ao processo de excreção viral, principalmente nas aves que foram imunossuprimidas com dexametasona. Observaram que os patos imunossuprimidos se tornavam mais suscetíveis ao vírus, aumentando a viremia e a taxa de excreção do vírus, o que sugere ter este fato levado a um aumento do peso do órgão. Ainda, Parede e Young (2013) também avaliaram a patogênese da DN em frangos de corte com diferentes níveis de anticorpos para a DN; observaram que as aves que foram expostas ao desafio com o vDN apresentaram um fígado com um peso maior em relação àquele das aves do grupo controle. Dessa forma, sugerimos que o desafio com o vDN em nosso trabalho tenha aumentado o peso relativo do fígado devido ao processo de viremia e consequente passagem do vírus pelo fígado da ave. No entanto, de forma oposta ao observado por Njagi et al. (2012), as aves do grupo E/V não apresentaram um peso relativo de fígado maior que as aves do grupo C/V, indicando que o estresse térmico por calor na primeira semana não interferiu a excreção do vDN.

Com relação ao peso relativo dos órgãos linfoides, como as aves não apresentam linfonodos, o baço e a bursa desempenham um papel fundamental na coordenação do SI, principalmente na interação com células B e T maduras durante uma resposta imunológica (GRASMAN, 2002). Com relação especificamente à bursa, ela é considerada um órgão linfoide crítico para o desenvolvimento de linfócitos B e consequentemente, para a produção de anticorpos (GLICK, 1991; FENG et al., 2011;). Com o passar da idade da ave, há maturação e consequente involução do órgão, sendo que o processo se finaliza com cerca de 5 a 7 semanas de vida das aves (DAVISON; KASPERS; SCHAT, 2008). Em nosso trabalho, observamos que as aves estressadas pelo calor apresentaram pesos relativos de baço e bursa maiores que aqueles dos animais dos grupos que foram mantidos na temperatura termonêutra. Estes dados discordam daqueles de Shini *et al.* (2008); neste trabalho, as aves nas quais foi feita a administração de corticosterona via água de bebida, mostraram redução do peso relativo do baço e da bursa, fatores que foram associados a um retardo do desenvolvimento dos mesmos (SHINI et al., 2010). De forma semelhante, Glick (1967) e Davison e Freeman (1985) identificaram que as aves para as quais foi feita a administração de ACTH e corticosterona, apresentaram uma redução do peso relativo dos órgãos linfoides avaliados (baço e bursa). Assim, levando-se em consideração o exposto e os dados já apresentados

por nosso trabalho, parece-nos possível levantar a hipótese de que o estresse tenha impedido o processo de involução natural da bursa, isto é, fazendo com que o seu peso relativo se mantenha maior nas aves submetidas ao protocolo de estresse. Neste sentido, é possível que os níveis de corticosterona nos pintinhos estressados deste trabalho, não tenham se modificado ou tenham atingido valores plasmáticos inferiores àqueles obtidos pelos autores citados após uso de corticosterona e ACTH em aves adultas. De fato, também o eixo HHA está em desenvolvimento nesta idade (ZULKIFLIA et al., 1994).

Com relação ao baço, deve-se considerar que em aves, de forma semelhante ao discutido para bursa, trata-se de um órgão linfoide intimamente ligado com a população de linfócitos B. Mas em contraste com o observado em mamíferos, o baço das aves não é considerado apenas como local de reserva de eritrócitos para liberação rápida na circulação ou, mesmo como um sítio primário para a diferenciação e proliferação antígeno dependente de linfócitos. Trata-se de um importante sítio para a linfopoiese embrionária, ou seja, é onde os progenitores de células B rearranjam seus genes referentes às imunoglobulinas antes da colonização na bursa (JEURISSEN, 1991; DAVISON; KASPERS; SCHAT, 2008). Neste contexto, sugerimos que a presença de um peso relativo de baço maior no grupo de aves estressadas possa estar relacionado à uma hiperplasia do órgão (CARDOSO; TESSARI; CASTRO, 2003).

Já com relação à análise feita aos 14 e 19 dias de vida das aves, não foram observadas diferenças referentes aos pesos relativos do baço e da bursa entre os grupos, podendo-se considerar que apesar do estresse térmico ter influenciado o peso relativo em um momento inicial de vida, há retorno aos pesos médios basais sete dias após o final do estímulo estressor. Porém, considerando-se a importância desses órgãos no desenvolvimento no SI da ave no que se refere principalmente ao desenvolvimento da imunidade humoral nas fases iniciais de vida, pode-se considerar que alterações na maturação desses órgãos reflitam, de alguma forma, na resposta imune da ave frente a desafios ambientais, mesmo quando avaliadas na idade adulta, assim como já colocado por Gross e Siegel (1983).

Neste sentido, estudos clássicos conduzidos por Hans Selye (1936) referentes ao estresse, caracterizam-no como uma síndrome em que se observam sinais e sintomas, incluindo-se aqui hipertrofia de glândulas adrenais, úlceras

gástricas e atrofia de órgãos linfoides (timo, baço e linfonodos). Desta forma, os presentes achados contrastam com o que foi observado na literatura e, até mesmo, com trabalhos desenvolvidos em nosso grupo na mesma linha. De fato, com relação aos pesos relativos dos órgãos linfoides; observamos que as aves estressadas apresentaram um maior peso relativo de baço e bursa em comparação às aves mantidas em uma temperatura termonêutra. É sabido que as alterações imunes induzidas pelo estresse dependem da espécie animal estressada, tipo de estressor, duração e frequência, além da relação temporal entre a aplicação do estresse a avaliação do SI (AVITSUR et al., 2003; BARTOLOMUCCI et al., 2005; QUEIROZ et al., 2008). Levando-se em consideração que nos diferentes trabalhos encontrados na literatura foram utilizados protocolos de estresse térmico por calor em frangos de corte adultos, pode-se supor que o estresse quando aplicado em aves jovens, modifique a maturação dos órgãos induzindo aumento do peso relativo dos mesmos. Não há como confirmar esta hipótese pelos presentes achados experimentais, quer nos parecer, no entanto, que o mecanismo envolvido seja independente do eixo HHA. Futuros experimentos poderão agregar informações a este fato.

Por tudo quanto exposto, pode-se dizer que o estresse por calor aplicado na primeira semana da ave induziu um aumento no peso relativo da bursa e do baço e uma redução do peso relativo do fígado. No entanto, uma vez que aos 14 e 19 dias não foram observadas diferenças entre os grupos analisados, sugere-se a existência de um mecanismo de plasticidade dos órgãos que aconteceria durante a fase de maturação dos mesmos. Porém, como já sabido, os efeitos do estresse no peso relativo desses órgãos observados na primeira semana de vida, refletiram até duas semanas após o fim do estímulo estressor para outros parâmetros analisados.

Neste sentido, outros autores têm observado que diferentes tipos de estressores modulam a resposta imune humoral de frangos de corte (MASHALY et al., 1998, 2004; POST; REBEL; TER HUURNE, 2003; SHINI et al., 2008). A participação da imunidade humoral é fundamental para o desenvolvimento de uma proteção adequada e suficiente da ave frente à vacinação, tornando-a apta a enfrentar os desafios de campo (AL-ZUBEEDY, 2009). Dentre os principais componentes da imunidade humoral, a IgM é uma molécula polimérica constituída por 5 subunidades de 180kDa; trata-se da principal imunoglobulina produzida durante uma resposta imune primária, ou seja, é a primeira a entrar em contato com

o antígeno; no entanto, possui uma menor importância em relação aos fluidos teciduais ou secreções corpóreas, mesmo em locais de inflamação aguda (YASUDA et al., 2003). A IgG, por sua vez, é uma molécula monomérica de 180kDa presente em respostas imunes secundárias (em geral, 72h após a IgM), ou seja, é produzida em um segundo momento após os desafios antigênicos (após a ação da IgM). A IgY é a molécula monomérica homóloga à IgG de mamíferos, mas presente em aves (YASUDA et al., 2003).

O estresse direciona a resposta imune para um padrão Th2, através do aumento da produção de citocinas ligadas ao desenvolvimento de uma imunidade humoral (CALCAGNI; ELENKOV, 2006). Em nosso trabalho, observamos maiores concentrações séricas de IgM nas aves submetidas ao protocolo de estresse térmico, fato constatado nos três períodos analisados; observamos, ainda, uma maior concentração sérica de IgY nas aves estressadas aos 7 dias de vida. Esses achados corroboram com aqueles relativos às concentrações de imunoglobulinas encontradas em aves submetidas ao estresse térmico por frio (ZHAO et al., 2013) e com dados provenientes de aves que receberam a clonidina, um agonista de receptores adrenérgicos (CHENG, 2006). Sugerimos, assim, que mesmo que classicamente haja a predominância de IgY na resposta imunológica secundária, a elevação da concentração de IgM no grupo E/V, em comparação com o grupo C/V aos 14 e 19 dias de vida da ave, esteja associado ao maior tempo necessário para que o SI da ave atue frente ao vDN, podendo-se relacionar este fato, a uma redução da capacidade do SI da ave de agir frente ao desafio vacinal.

Com relação à concentração de IgY, observou-se que as aves que foram vacinadas apresentaram uma redução da concentração sérica desta imunoglobulina, podendo este achado estar associado com o seu direcionamento para o tecido/órgãos linfoides nos quais o desafio vacinal estaria atuando. Este fato é condizente com o observado por Nasrin et al. (2013), que mostraram em aves que receberam o vDN e o estresse por calor, um aumento da concentração local de IgY em células da traqueia, tonsilas cecais e glândula de Harder. Post, Rebel e Ter Huurne (2003) observaram que elevadas concentrações plasmáticas de corticosterona reduziam a resposta induzida por hemácias de carneiro, assim como já havia sido avaliado por outros autores, relacionando estes achados a depressão

da imunidade humoral dessas aves (EDENS; SIEGEL, 1975; KHANSARI; MURGO; FAITH, 1990; MORAES et al., 1994; MASHALY et al., 2004).

Foi observado também que o estresse térmico por calor na primeira semana modulou o perfil de resposta da ave para um padrão Th2, associado à imunidade humoral e identificado pelo aumento da concentração sérica de IgM (nos três períodos analisados) e IgY (apenas aos 7 dias de vida).

Outra forma de avaliar o efeito do estresse sobre o SI das aves frente ao desafio vacinal com o vDN, é analisando-se a porcentagem de linfócitos T totais, auxiliares e citotóxicos e linfócitos B. Sabe-se ser o tráfego de células imunes crucial para a resposta imune, bem como para as suas funções efetoras. Com relação especificamente aos linfócitos B, tratam-se de células classicamente responsáveis pela produção de anticorpos, a partir da exposição a agentes estranhos. Já com relação a linfócitos T, pode-se considerar que o processo de reconhecimento de antígenos é altamente sofisticado e mediado por seus receptores, que são aleatoriamente gerados e reconhecem uma grande variedade de peptídeos presentes no complexo de histocompatibilidade maior (DAVISON; KASPERS; SCHAT, 2008). A maioria das características funcionais dos linfócitos T observadas em mamíferos podem ser aplicadas em aves, sendo que as maiores diferenças entre eles residem em seus receptores (DAVISON; KASPERS; SCHAT, 2008). Os dados sugerem que o estresse tenha direcionado o perfil de linfócitos no sangue periférico, para uma elevação das porcentagens de linfócitos T auxiliares e citotóxicos e, também, que tenha induzido uma redução da porcentagem de linfócitos B no sangue periférico. Tal fato difere do que foi observado por Gross e Siegel (1983), que avaliaram a razão H:L em frangos de corte estressados; estes autores observaram que o estresse induziu uma redução de linfócitos e um aumento de heterofilos circulantes. Khajavi et al. (2010) também observaram que frangos de corte submetidos a um protocolo de estresse térmico por calor de 39°C por 7h/dia mantidos por 6 dias, redução dos títulos de anticorpos frente ao desafio com hemácias de carneiro, além de uma redução número de linfócitos auxiliares e citotóxicos. Porém, deve-se considerar que vários fatores podem interferir na resposta imunológica do organismo da ave frente ao agente estressor, em especial, a idade das aves, como o observado por Zulkiflia et al. (1994). Estes autores mostram que o estresse em aves jovens induziu um aumento da população de

linfócitos e redução de heterofilos no sangue periférico, o que concorda com os presentes achados.

Já é conhecida a importância de linfócitos B e anticorpos na ação contra o vírus, isto é, no sentido de reconhecer seus epítopos e neutralizar a sua ação; mas também se torna relevante citar os mecanismos imunes desencadeados para a eliminação de células já infectadas pelo agente viral (COLLISSON et al., 2000). Neste sentido, a resposta imune celular envolve vários mecanismos efetores, incluindo a ação de linfócitos T citotóxicos, células NK e macrófagos, além da ação de citocinas. A literatura tem descrito a importância dos linfócitos T na proteção orgânica contra doenças como a Doença de Marek (MARKOWSKI-GRIMSRUD; SCHAT, 2002), bronquite infecciosa (COLLISSON et al., 2000) e outras doenças virais (SHARMA et al., 2000; MARKOWSKI-GRIMSRUD; SCHAT, 2002). Uma das principais funções dos linfócitos T citotóxicos em mamíferos é a de controlar diversas infecções virais. A ativação da atividade citolítica exige um contato direto com as células apresentadoras de antígeno, que reconhece os peptídeos virais estranhos ao organismo do animal. Além disso, embora os linfócitos T citotóxicos sejam os principais responsáveis pela atividade citolítica, os linfócitos T auxiliares também apresentam essa função embora em menor escala.

Sugere-se, assim, que a presença de uma maior porcentagem de linfócitos T (totais, auxiliares e citotóxicos) causada pelo estresse esteja associada ao aumento do tempo necessário para debelar a infecção devido a uma redução da capacidade do SI de solucionar o processo infeccioso, impedindo o desenvolvimento de proteção frente ao vírus da Doença de Newcastle. Essa maior dificuldade em debelar a infecção pode estar associada ao aumento de componentes característicos de uma resposta imune inespecífica.

Com relação especificamente à população de linfócitos B aos 14 e 19 dias, observou-se que o grupo de aves vacinadas (C/V) apresentou a maior porcentagem de linfócitos B com relação aos demais grupos, fato esperado visto que em aves desafiadas com o vDN, predomina a imunidade humoral (AL-ZUBEEDY, 2009). Este achado seria consequência do reconhecimento dos epítopos do agente viral, neutralização da sua ação e formação da memória celular, esperada na vacinação. Além disso, também se observou que o grupo de aves que recebeu a vacina e foi submetido ao estresse apresentou uma menor porcentagem de linfócitos B,

indicando este fato que o estresse possa ter modificado o tipo de resposta imune que seria desenvolvido pela ave. Nesse sentido, uma menor porcentagem de linfócitos B no grupo que recebeu a vacina e foi estressado em comparação com o grupo que apenas recebeu a vacina, pode também estar relacionado a uma redução dessa atividade imune frente à vacinação, levando-se em consideração que o desenvolvimento da proteção necessita da formação da memória do vDN no SI da ave. Já quando da análise de linfócitos T auxiliares e citotóxicos aos 14 e 19 dias de vida, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos estressados e não estressados; porém, observou-se que o desafio vacinal reduziu a porcentagem de ambas as populações, fato este característico do tipo de resposta encontrada do SI da ave frente a um desafio vacinal (AL-ZUBEEDY, 2009).

Neste sentido e a partir do exposto, pode-se dizer que o estresse térmico por calor aplicado na primeira semana de vida tenha modificado o padrão de resposta do SI das aves vacinadas; de relevância, mostrou-se que este fato que teve repercussões até mesmo 3 semanas após o fim do estímulo estressor.

Atualmente, o impacto do aumento da temperatura ambiente sobre o desenvolvimento do sistema termorregulador de pintinhos ainda não foi completamente elucidado (ZULKIFLIA et al., 1994). Em climas tropicais, as técnicas de manejo que preconizam o aquecimento dos pintinhos na primeira semana de vida são usuais; o frio é uma grande preocupação nessa fase de vida da ave. Porém, também é bastante comum a elevação da temperatura de forma exacerbada nesta fase de vida, fazendo com que os pintinhos sejam submetidos ao estresse térmico. Levando-se em conta que diversos trabalhos na literatura têm associado o estresse térmico à redução de parâmetros imunes em frangos de corte (CHROUSOS, 1999; CALCAGNI; ELENKOV et al., 2000; ELENKOV, 2002; ELENKOV, 2004; VIZI; ELENKOV, 2006; QUINTEIRO-FILHO et al., 2012), torna-se interessante avaliar se esta prática de manejo em nível de campo na primeira semana de vida dos animais seria capaz de modificar a resposta imune da ave e até mesmo se haveria um processo de recuperação do organismo com o passar do tempo.

Pela análise dos dados obtidos neste experimento, pode-se assumir que o estresse térmico por calor direciona o perfil de células do SI no sangue periférico da ave para linfócitos T auxiliares e citotóxicos, enquanto que a vacina isoladamente induz um perfil celular de linfócitos B. Assim como observado por Mohamed e

Hanson (1980) e Njagi (2012), o estresse tornou as aves de nosso trabalho mais suscetíveis à infecção do vDN, por prejudicar a resposta das aves à vacina, tornando-as mais suscetíveis aos desafios ambientais, sugerindo ocorrência de prejuízos que afetariam diretamente a produtividade e a sanidade do sistema de criação.

Em 1983, Gross e Siegel mostraram que a estimulação fisiológica no início da vida de frangos de corte (quando os sistemas da ave ainda estão desenvolvidos) resultaram em impactos que persistiriam por longo prazo, impactando, para pior, o potencial genético do plantel (GROSS; SIEGEL, 1983). De fato, observamos que o estresse térmico por calor aplicado na primeira semana de vida de aves vacinadas induziu mudanças significativas em termos de concentração de imunoglobulinas (IgY e IgM) e peso relativo de órgãos (baço, bursa e fígado) fatos associados a uma modulação do SI, que culminou em prejuízos para a resposta imunológica da ave.

7 CONCLUSÕES

7.1 Conclusões Específicas

Concluimos que o estresse por calor ($38\pm 2^{\circ}\text{C}$) aplicado de em frangos de corte na primeira semana de vida desencadeou:

- ❖ redução do peso relativo do fígado aos 7 dias de vida das aves;
- ❖ aumento do peso relativo do baço e da bursa aos 7 dias de vida das aves;
- ❖ aumento das concentrações séricas de IgY e IgM, sendo que a concentração de IgY foi mantida elevada até os 7 dias de vida e a de IgM até mesmo aos 19 dias de vida das aves;
- ❖ altera o perfil de células do sistema imune das aves vacinadas, isto é, reduzindo a porcentagem de linfócito B e aumentando a porcentagem de T citotóxicos e auxiliares no sangue periférico.

7.2 Conclusão Geral

O estresse por calor aplicado na primeira semana de vida da ave interferiu no desenvolvimento do sistema imunológico, observado pela diminuição do peso relativo de fígado e aumento do peso relativo de baço e bursa; e prejudicou a resposta frente ao desafio vacinal, mostradas pela alteração do perfil de linfócitos T e B. Sugere-se que essas alterações por impediram o desenvolvimento da proteção e memória imunológica ao agente infeccioso (Doença de Newcastle) afetando diretamente a sanidade e a produtividade da criação em médio e longo prazo.

REFERÊNCIAS

ABUDABOS, A. M.; ELSAYED, S.; HUSSEIN, E. O. S.; AL-ATYAT, R. M.; AL-HAIDARY, A. Influence of stocking density on welfare indices of broilers. **Italian Journal of Animal Science**, v. 12, n. 2, p. 213-218, 2013.

ADER, R. On the development of psychoneuroimmunology. **European journal of pharmacology**, v. 405, n. 1-3, p. 167-76, 2000.

ALVES, G. J. VISMARI, L.; FLORIO, J. C.; PALERMO-NETO, J. Cohabitation with a sick cage mate: Effects on noradrenaline turnover and neutrophil activity. **Neuroscience Research**, v. 56, n. 2, p. 172-179, 2006.

ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. Neuroimunomodulação : influências do sistema imune sobre o sistema nervoso central **Revista Neurociências**. v. 18, n. 2, p. 214-219, 2010.

ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. Neuroimunomodulação : sobre o diálogo entre os sistemas nervoso e imune. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29, n. 5511, p. 363-369, 2007.

AL-ZUBEEDY, A. Z. Immune response in day old broiler chicks vaccinated against Newcastle disease virus. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v. 23, n. 9, p. 143-146, 2009.

ASCHBACHER, K.; O'DONOVAN, A.; WOLKOWITZ, O. M.; DHABHAR, F. S.; SU Y.; EPEL, E. Good stress, bad stress and oxidative stress: Insights from anticipatory cortisol reactivity. **Psychoneuroendocrinology**, v.13, n.9 , p.42-45, 2013.

AVITSUR, R.; STARK, J. L.; DHABHAR, F. S.; KRAMER, K. A.; SHERIDAN, J. F. Social experience alters the response to social stress in mice. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 17, n. 6, p. 426-437, 2003.

BARTOLOMUCCI, A.; PALANZA, P.; SACERDOTE, P.; PANERAI, A. E.; SGOIFO, A.; DANTZER, R.; PARMIGIANI, S. Social factors and individual vulnerability to chronic stress exposure. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 1, p. 67-81, 2005.

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

BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E. Network of immune-neuroendocrine interactions. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 27, n. 1, p. 1-12, 1977.

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

BLALOCK, J. E.; BOST, K. L.; SMITH, E. M. Neuroendocrine peptide hormones and their receptors in the immune system. Production, processing and action. **Journal of Neuroimmunology**, v. 10, n. 1, p. 31-40, 1985.

BLASI, A. de; PARRUTI, G.; SALLESE, M. Regulation of G protein-coupled receptor kinase subtypes in activated T lymphocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 95, p. 203-210, 1995.

BORGES, S. A.; FISHER DA SILVA, A. V.; ARIKI, J.; HOOGEM, D. M.; CUMMINGS, K. R. Dietary electrolyte balance for broiler chickens exposed to thermoneutral or heat-stress environments. **Poultry Science**, v. 82, n. 3, p. 428-35, 2003.

BROSSI, C.; CONTRERAS-CASTILLO, C. J.; AMAZONAS, E. A.; MENTEN, J. F. M. Estresse térmico durante o pré-abate em frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p. 1284-1293, 2009.

BUTTGEREIT, F.; SCHEFFOLD, A. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. **Steroids**, v. 67, n. 6, p. 529-534, 2002.

CAFE, L. M.; ROBINSON, D.L.; FERQUSON, D.M.; GEESINK, G.H.; GREENWOOD, P.L. Temperament and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function are related and combine to affect growth, efficiency, carcass, and meat quality traits in Brahman steers. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 230-240, 2011.

CALCAGNI, E.; ELENKOV, I. Stress system activity, innate and T helper cytokines, and susceptibility to immune-related diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1069, p. 62-76, 2006.

CAO, L.; HUDSON, C. A; LAWRENCE, D. A. Acute cold/restraint stress inhibits host resistance to *Listeria monocytogenes* via β 1-adrenergic receptors. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 17, n. 2, p. 121-133, 2003.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M. Estudo hematológico em aves inoculadas com *Salmonella gallinarum*. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 70, p. 35-42, 2003.

CHEN, X.; JIANG, R.; GENG, Z. Cold stress in broiler: global gene expression analyses suggest a major role of CYP genes in cold responses. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 1, p. 425-429, 2012.

CHENG, H. W. The immunomodulatory effects of clonidine, an alpha-2-adrenergic agonist, in laying hens. **Poultry Science**, v. 85, n. 3, p. 452-456, 2006.

CLARK, C. E.; DAS, G. P. Effect of High Environmental Temperature on Internal Organs of Chickens. **Poultry science**, v. 53, n. 3, p. 859-863, 1974.

COHEN, J. J. Thymus-derived lymphocytes sequestered in the bone marrow of hydrocortisone-treated mice. **Journal of immunology**, v. 108, n. 3, p. 841-4, 1972.

COLLISSON, E. W.; PEI, J.; DZIELAWA, J.; SEO, S. H. Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry. **Developmental and comparative immunology**, v. 24, n. 2-3, p. 187-200, 2000.

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

CUNNICK, J. E.; LYSLE, D.T.; KUCINSKI, B.J.; RABIN, B.S. Evidence that shock-induced immune suppression is mediated by adrenal hormones and peripheral beta-adrenergic receptors. **Pharmacology Biochemistry, and Behavior**, v. 36, n. 3, p. 645-651, 1990.

CZEGLÉDI, A.; UJVÁRI, D.; SOMOGVI, E.; WEHMANN, E.; WENER, O.; LOMNICZI, B. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. **Virus Research**, v. 120, n. 1-2, p. 36-48, 2006.

DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K. (Ed.1). **Avian immunology**. London, San Diego, CA: Elsevier, 2008. p. 67-90

DAVISON, T. F.; FREEMAN, B. M.; REA, J. Effects of Continuous or Corticosterone Treatment with Synthetic ACTH1-24 on Immature Gallus domesticus. **General and Comparative Endocrinology**, v. 423, p. 416-423, 1985.

DE BATTISTI, C.; SALOMONI, A.; ORMELLI, S.; MONNE, I.; CAPUA, I.; CATTOLI, G. Rapid pathotyping of Newcastle Disease Virus by pyrosequencing. **Journal of Virological Methods**, v. 188, n. 1-2, p. 13-20, 2013.

DHABHAR, F. S. Psychological stress and immunoprotection versus immunopathology in the skin. **Clinics in Dermatology**, v. 31, n. 1, p. 18-30, 2013.

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

DOMÍNGUEZ-GERPE, L.; REY-MÉNDEZ, M. Time-course of the murine lymphoid tissue involution during and following stressor exposure. **Life Sciences**, v. 61, n. 10, p. 1019-1027, 1997.

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

ECCO, R.; SUSTA, L.; AFONSO, C. L.; MILLER, O. J.; BROWN, C. Neurological lesions in chickens experimentally infected with virulent Newcastle disease virus isolates. **Avian Pathology**, v. 40, n. 2, p. 145-152, 2011.

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

ELENKOV, I. J.; WILDER, R. L.; CHROUSOS, G. P.; VIZI, E. S. The sympathetic nerve an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 595-638, 2000.

ELENKOV, I. J. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1024, p. 138-146, 2004.

ELENKOV, I. J.; CHROUSOS, G. P. Stress, cytokine patterns and susceptibility to disease. **Clinical endocrinology & metabolism**, v. 13, n. 4, p. 583-595, 1999.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2013. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>>. Acessado em: 20 maio 2013.

ENGLER, H. Social stress and T cell maturation in male rats: transient and persistent alterations in thymic function. **Psychoneuroendocrinology**, v. 28, n. 8, p. 951-969, 2003.

ENGLER, H.; BAILEY, M. T.; ENGLER, A.; SHERIDAN, J. F. Effects of repeated social stress on leukocyte distribution in bone marrow, peripheral blood and spleen. **Journal of neuroimmunology**, v. 148, n. 1-2, p. 106-115, 2004.

ERDEI, J.; BACHIR, K.; KALETA, E. F.; SHORTRIDGE, K. F.; LOMNICZI, B. Newcastle disease vaccine (La Sofa) strain specific monoclonal antibody. **Archives of Virology**, v. 96, p. 265-269, 1987.

ESTEVEZ, I. Density allowances for broilers: where to set the limits? **Poultry science**, v. 86, n. 6, p. 1265-72, 2007.

FENG, X.; LIU, T.; WANG, F.; CAO, R.; ZHOU, B.; ZHANG, Y. MAO, X.; CHEN, P.; ZHANG, H. Isolation, antiproliferation on tumor cell and immunomodulatory activity of BSP-I, a novel bursal peptide from chicken humoral immune system. **Peptides**, v. 32, n. 6, p. 1103-1109, 2011.

FERRAZ-DE-PAULA, V.; STANKEVICIUS, D.; RIBEIRO, A.; PINHEIRO, M. L.; RODRIGUES-COSTA, E. C.; FLORIO, J. C.; LAPACHINSKE, S. F.; MOREAU, R. L.; PALERMO-NETO, J. (MDMA-ecstasy) in anxiety-like responses in mice Differential behavioral outcomes of responses in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 5, p. 428-437, 2011.

FONSECA, E. S. M.; MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J. Effects of prenatal stress on stress-induced changes in behavior and macrophage activity of mice. **Physiology & Behavior**, v. 77, n. 2-3, p. 205-215, 2002.

FURLAN, R. L. Influência da temperatura na produção de frangos de corte. **In: SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA**, 7., 2006, Chapecó. 2006. p. 104-135.

GALLILI, G. E.; BEM-NATHAN, D. Newcastle disease vaccines. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 2, p. 343-66, 1998.

- GARRIGA, C.; HUNTER, R. R.; AMAT, C.; PLANAS, J. M.; MITCHELL, M. A.; MORETÓ, M. Heat stress increases apical glucose transport in the chicken jejunum. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 1, p. R195-201, 2006.
- GIVISIEZ, P. E. N.; SILVA, M. M.; FERRO, M. I. T.; FERRO, J. A.; GONZALES, E.; MACARI, M. Heat or cold chronic stress affects organ weights and Hsp70 levels in chicken embryos. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 81, n. 1, p. 83-87, 2001.
- GLICK, B. Antibody and gland studies in cortisone and ACTH-injected birds. **Journal of Immunology**, v. 98, n. 5, p. 1076-1084, 1967.
- 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.
- GLIMCHER, L. H.; MURPHY, K. M. Lineage commitment in the immune system : the T helper lymphocyte grows up. **Genes & development**, v. 14, n. 14, p. 1693-1711, 2000.
- GRAEFF, E. O.; HUNZIKER, M. H.; GRAEFF, F. G. Effects of ipsapirone and BAY R 1531 on learned helplessness. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 22, n. 9, p.1141-1144, 1989.
- GRASMAN, K. A. Assessing immunological function in toxicological studies of avian wildlife. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, n. 1, p. 34-42, 2002.
- GROSS, W. B.; SIEGEL, H. S. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. **Avian Diseases**, v. 27, n. 4, p. 972-979, 1983.
- GUPTA, S.; EARLEY, B.; CROWE, M. A. Effect of 12-hour road transportation on physiological, immunological and haematological parameters in bulls housed at different space allowances. **Veterinary Journal**, v. 173, n. 3, p. 605-616, 2007.
- HALEVY, O.; KRISPIN, A.; LESHEM, Y.; MCMURTRY, J. P.; YAHAV, S. Early-age heat exposure affects skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation in chicks. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 281, n.1, p. R302-R309, 2013.
- HAN, A. Y.; ZHANG, M. H.; ZUO, X. L.; ZHENG, S. S.; ZHAO, C. F.; FENG, J. H.; CHENG, C. Effect of acute heat stress on calcium concentration, proliferation, cell cycle, and interleukin-2 production in splenic lymphocytes from broiler chickens. **Poultry Science**, v. 89, n. 10, p. 2063-2070, 2010.
- 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.
- HOERR, F. J. Clinical Aspects of Immunosuppression in Poultry. **Avian Diseases**, v. 54, n. 1, p. 2-15, 2010.

HOSSEINZADEH, H.; GOLDSCHNEIDER, I. Recent thymic emigrants in the rat express a unique antigenic phenotype and undergo post-thymic maturation in peripheral lymphoid tissues. **Journal of Immunology**, v. 150, n. 5, p. 1670-1679, 1993.

HU, Z.; HU, J.; LIU, X.; WANG, X.; ZHU, J.; LIU, X. Strong innate immune response and cell death in chicken splenocytes infected with genotype VIIId Newcastle disease virus. **Virology Journal**, v. 9, n. 1, p. 208, 2012.

DOZIER, W. A.; THAXTON, J. P.; PURSWELL, J. L.; OLANREWaju, H. A.; BRANTON, S. L.; ROUSH, W. B. Stocking density effects on male broilers grown to 1.8 kilograms of body weight, **Poultry Science**, v. 708, p. 344-351, 2005.

IMIK, H.; ATASEVER, M. A.; URCAR, S.; OZLU, H.; GUMUS, R.; ATASEVER, M. Meat quality of heat stress exposed broilers and effect of protein and vitamin E. **British Poultry Science**, v. 53, n. 5, p. 689-698, 2012.

JEURISSEN, S. H. Structure and function of the chicken spleen. **Research in Immunology**, v. 142, n. 4, p. 352-355, 1991.

JOHNSON, R. W. Immune and endocrine regulation of food intake in sick animals. **Domestic animal endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 309-319, 1998.

KAISER, P. Advances in avian immunology--prospects for disease control: a review. **Avian pathology**, v. 39, n. 5, p. 309-324, 2010.

KAPCZYNSKI, D. R.; AFONSO, C. L.; MILLER, P. J. Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. **Developmental and Comparative Immunology**, v.13, p. S0145-S305X, 2013.

KELLEY, S. P.; GROTA, L. J.; FELTEN, S. Y.; MADDEN, K. S.; FELTENM, D. L. Norepinephrine in mouse spleen shows minor strain differences and no diurnal variation. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 53, n. 1, p. 141-146, 1996.

KHAJAVI, M.; RAHIMI, S.; HASSAN, Z.M., KAMALI, M.A.; MOUSAVI, T. Effect of feed restriction early in life on humoral and cellular immunity of two commercial broiler strains under heat stress conditions. **British poultry science**, n. 6, p. 37-41, 2010.

KHANSARI, D. N.; MURGO, A J.; FAITH, R. E. Effects of stress on the immune system. **Immunology today**, v. 11, n. 5, p. 170-175, 1990.

KHONGDEE, S.; CHAIYABUTR, N.; HINCH, G.; MARKVICHITR, K.; VAJRABUKKA, C. Effects of evaporative cooling on reproductive performance and milk production of dairy cows in hot wet conditions. **International Journal of Biometeorology**, v. 50, n. 5, p. 253-257, 2006.

KIM, D.; LAWRENCE, D. A. Immunotoxic effects of inorganic lead on host resistance of mice with different circling behavior preferences. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 14, n. 4, p. 305-317, 2000.

KOKAIA, Z.; MARTINO, G.; SCHWARTZ, M.; LINDVALL, O. Cross-talk between neural stem cells and immune cells: the key to better brain repair? **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 8, p. 1078-1087, 2012.

KUIS, W.; JONG-DE VOS VAN STEENWIJ, C.; SINNEMA, G.; KAVELAARS, A.; PRAKKEN, B.; HELDERS, P. J.; HEIJNEN, C. J. The autonomic nervous system and the immune system in juvenile rheumatoid arthritis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 10, n. 4, p. 387-398, 1996.

LAGANA, C. **Otimização da produção de frango de corte em condições de estresse por calor**. 2005. 180 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

LI, C.; WANG, X.; WANG, G.; LI, N.; WU, C. Expression analysis of global gene response to chronic heat exposure in broiler chickens (*Gallus gallus*) reveals new reactive genes. **Poultry science**, v. 90, n. 5, p. 1028-1036, 2011.

LIBERMAN, A. C.; DRUKER, J.; PERONE, M. J.; ARZT, E. Glucocorticoids in the regulation of transcription factors that control cytokine synthesis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 18, n. 1-2, p. 45-56, 2007.

LIBERMAN, A. C.; DRUKER, J.; REFOJO, D.; HOLSBOER, F.; ARZT, E. Glucocorticoids inhibit GATA-3 phosphorylation and activity in T cells. **FASEB Journal**, v. 23, n. 5, p. 1558-1571, 2009.

LIBERMAN, A. C.; REFOJO, D.; ARZT, E. Cytokine signaling/transcription factor cross-talk in T cell activation and Th1-Th2 differentiation. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 51, n. 6, p. 351-365, 2003.

LIGEIRO-OLIVEIRA, A. P.; FIALHO DE ARAÚJO, A. M.; LAZZARINI, R.; SILVA, Z. L.; DE NUCCI, G.; MUSCARÁ, M. N.; TAVARES DE LIMA, W.; PALERMO-NETO, J. Effects of amphetamine on immune-mediated lung inflammatory response in rats. **Neuroimmunomodulation**, v. 11, n. 3, p. 181-190, 2004.

LUO, C.; QU, H.; MA, J.; WANG, J.; LI, J.; YANG, C.; HU, X.; LI, N.; SHU, D. Genome-wide association study of antibody response to Newcastle disease virus in chicken. **BMC Genetics**, v. 14, p. 42, 2013.

MACARIO, E. C. de; MACARIO, A. J. L. Stressors, stress and survival; overview. **Frontiers in Bioscience**, n. 5, p. 780-786, 2000.

MADDEN, K. S.; SANDERS, V. M.; FELTEN, D. L. Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 35, p. 417-448, 1995.

MARKOWSKI-GRIMSRUD, C.; SCHAT, K. Cytotoxic T lymphocyte responses to Marek's disease herpesvirus-encoded glycoproteins. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 90, n. 3-4, p. 133-144, 2002.

MASHALY, M. M.; TROUT, J. M.; HENDERISCKS, 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.; HENDRICKS, 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.

MISHLER, J. M.; SHARP, A. A. Adrenaline: further discussion of its rolr in the mobilization of neutrophils. **Scandinavian Journal of Haematology**, v. 17, n. 1, p. 1975, 1976.

MOHAMED, M. A; HANSON, R. P. Effect of social stress on Newcastle disease virus (LaSota) infection. **Avian Diseases**, v. 24, n. 4, p. 908-915, 1980.

OTTAWAY, C. A.; HUSBAND, A. J. Communication the influence of neuroendocrine pathways on lymphocyte migration. **Immunology Today**, v. 2114, p. 2108-2114, 1994.

MORROW-TESCH, J. L.; MCGLONE, J. J.; SALAK-JOHNSON, J. L. Heat and social stress effects on pig immune measures. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 10, p. 2599-609, 1994.

MUJAHID, A.; FURUSE, M. Behavioral responses of neonatal chicks exposed to low environmental temperature. **Poultry Science**, v. 88, n. 5, p. 917-922, 2009.

MUMMA, J. O.; THAXTON, J. P.; VIZZIER-THAXTON, Y.; DODSON, W. L. Physiological stress in laying hens. **Poultry Science**, v. 85, n. 4, p. 761-769, 2006.

NANCE, D. M.; SANDERS, V. M. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). **Brain, Behavior, and Immunity**. v. 21, n. 6, p. 736-745, 2007.

NASRIN, M.; KHAN, M. Z.; SIDDIGI, M. N.; MASUM, M. A. Mobilization of immunoglobulin (Ig)-containing plasma cells in Harderian gland, cecal tonsil and trachea of broilers vaccinated with Newcastle Disease Vaccine. **Tissue & Cell**, v. 45, n. 3, p. 191-197, 2013.

NEYLAN, T. C. Hans selye and the field of stress research. **Neurophysiol. Classics**, v. 10, n. 2, p. 230-231, 1998.

NJAGI, L. W.; NYAGA, P. N.; BEBORA, L. C.; MBUTHIA, P. G.; MINGA, U. M. Effect of immunosuppression on newcastle disease virus persistence in ducks with different immune status. **ISRN veterinary science**, v. 2012, p. 1-6, 2012.

PALERMO-NETO, J.; FONSECA, E. A.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; CORREIA, C. S.; SAKAI, M. Effects of individual housing on behavior and resistance to Ehrlich tumor growth in mice. **Physiology & Behavior**, v. 95, n. 3, p. 435-440, 2008.

PAREDE, L.; YOUNG, P. L. The pathogenesis of velogenic Newcastle disease virus infection of chickens of different ages and different levels of immunity. **Avian Diseases**, v. 34, n. 4, p. 803-808, 2013.

PATRÍCIO, I. S. Vinte anos do desempenho de frango nas condições brasileiras. In: CONFERÊNCIA FACTA. 2011, Santos. Anais 2011. v. 6, p.91-112, 2011.

PLAVNIK, I.; YAHAV, S. Research notes: effect of environmental temperature on broiler chickens subjected to growth restriction at an early age. **Poultry Science**, v.77, n. 2249, p. 870-872, 1998.

POST, J.; REBEL, J. M. J.; TER HUURNE, A A H. M. 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. 1313-8, 2003.

PUVADOLPIROD, S.; THAXTON, J. P. Model of physiological stress in chickens 1. Response parameters. **Poultry science**, v. 79, n. 3, p. 363-9, 2000.

QUEIROZ, J. D. S.; TORELLO, C.O.; PALERMO-NETO, J.; VALADARES, M.C.; QUEIROZ, M.L. Hematopoietic response of rats exposed to the impact of an acute psychophysiological stressor on responsiveness to an in vivo challenge with *Listeria monocytogenes*: modulation by *Chlorella vulgaris* prophylactic treatment. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 22, n. 7, p. 1056-65, 2008.

QUINTEIRO-FILHO, W. M.; RIBEIRO, A.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; PINHEIRO, M.L.; SAKAI, M.; SÁ, 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. 1905-14, 2010.

QURESHI, M. A.; HUSSAIN, I.; HEGGEN, C. L. Understanding immunology in disease development and control. **Poultry Science**, v. 77, n. 8, p. 1126-9, 1998.

RAMER-QUINN, D. S.; SWANSON, M.A.; LEE, W.T.; SANDERS, V.M. Cytokine production by naive and primary effector CD4+ T cells exposed to norepinephrine. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 14, n. 4, p. 239-55, 2000.

RIBEIRO, A.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; PINHEIRO, M.L.; PALERMO-NETO, J. Dose-response effects of systemic anandamide administration in mice sequentially submitted to the open field and elevated plus-maze tests. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 6, p. 556-60, 2009.

RICE, P. A; BOEHM, G.W.; MOYNIHAN, J.A.; BELLINGER, D.L.; STEVENS, S.Y. Chemical sympathectomy increases the innate immune response and decreases the specific immune response in the spleen to infection with *Listeria monocytogenes*. **Journal of Neuroimmunology**, v. 114, n. 1-2, p. 19-27, 2001.

RICE, P. A.; BOEHM, G.W.; MOYNIHAN, J.A.; BELLINGER, D.L.; STEVENS, S.Y. Chemical sympathectomy alters numbers of splenic and peritoneal leukocytes. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 16, n. 1, p. 62-73, 2002.

RICE, P. A.; BOEHM, G.W.; MOYNIHAN, J.A.; BELLINGER, D.L.; STEVENS, S.Y. Chemical sympathectomy increases numbers of inflammatory cells in the peritoneum early in murine listeriosis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 16, n. 6, p. 654-662, 2002.

RWUAAN, J. S.; REKWOT, P. I.; OMONTESE, B. O. Effect of a velogenic newcastle disease virus on body and organ weights of vaccinated Shika brown cocks. **Sokoto Journal of Veterinary Sciences**, v. 10, n. 2, p. 7-12, 2012.

SAPOLSKY, ROBERT; ROMERO, M. M. A. U. How Do glucocorticoids influence stress responses. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 1, p. 55-89, 2000.

SÁ-ROCHA, V. M.; SÁ-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J. Variations in behavior, innate immunity and host resistance to B16F10 melanoma growth in mice that present social stable hierarchical ranks. **Physiology & Behavior**, v. 88, n. 1-2, p. 108-115, 2006.

SCHEDLOWSKI, M.; FALK, A.; ROHNE, A.; WAGNER, T.O.; JACOBS, R.; TEWES, U.; SCHMIDT, R.E. Catecholamines induce alterations of distribution and activity of human natural killer (NK) cells. **Journal of Clinical Immunology**, v. 13, n. 5, p. 344-51, 1993.

SCOTT, L. V.; DINAN, T. G. Vasopressin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function : implications for the pathophysiology of depression. **Life Sciences**, v. 62, n. 22, p. 1985-1998, 1998.

SELIGER, C.; SCHAERER, B.; KOHN, M.; PENDL, H.; WEIGEND, S.; KASPERS, B.; HÄRTLE, S. A rapid high-precision flow cytometry based technique for total white blood cell counting in chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 145, n. 1-2, p. 86-99, 2012.

SELL, K. M.; CROWE, S. F.; KENT, S. Lipopolysaccharide induces biochemical alterations in chicks trained on the passive avoidance learning task. **Physiology & Behavior**, v. 78, n. 4-5, p. 679-88, 2003.

SEVI, A.; ALBENZIO, M.; ANNICCHIARICO, G.; CAROPRESEM, M.; MARINO, R.; TAIBI, L. Effects of ventilation regimen on the welfare and performance of lactating ewes in summer. **Journal of animal science**, v.80, n.9, p. 2349-2361, 2013.

SHARMA, J. M.; KIM, I.J.; RAUTENSCHLEIN, S.; YEH, H.Y. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 24, n. 2-3, p. 223-35, 2000.

SHINI, S.; KAISER, P.; SHINI, A.; BRYDEN, W.L. Biological response of chickens (*Gallus gallus domesticus*) induced by corticosterone and a bacterial endotoxin. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 149, n. 2, p. 324-33, 2008.

SHINI, S.; KAISER, P.; SHINI, A.; BRYDEN, W.L. Differential alterations in ultrastructural morphology of chicken heterophils and lymphocytes induced by corticosterone and lipopolysaccharide. **Veterinary immunology and Immunopathology**, v. 122, n. 1-2, p. 83-93, 2008.

SHINI, S.; HUFF, G.R.; SHINI, A.; KAISER, P. Understanding stress-induced immunosuppression: exploration of cytokine and chemokine gene profiles in chicken peripheral leukocytes. **Poultry science**, v. 89, n. 4, p. 841-51, 2010.

SHINI, S.; KAISER, P. Effects of stress, mimicked by administration of corticosterone in drinking water, on the expression of chicken cytokine and chemokine genes in lymphocytes. **Stress**, v. 12, n. 5, p. 388-99, 2009.

SNOECK, C. J.; OWOADE, A.A.; COUACY-HYMAN, E.; ALKALI, B.R.; OKWEN, M.P.; ADEYYANJU, A.T.; KOMOYO, G.F.; NAKOUNÉ, E.; LE FAOU, A., MULLER, C.P. High genetic diversity of Newcastle disease virus in poultry in West and Central Africa: co-circulation of genotypes XIV and newly defined genotypes XVII and XVIII. **Journal of Clinical Microbiology**, v.51, n.7, p. 2250-60, 2013.

SIEGEL, H.S. The relation between crowding and weight of adrenal glands in chickens. **Ecology**, v.40, n.3, p.495-498, 1959.

STANKEVICIUS, D.; RODRIGUES-COSTAM E.C.; CAMILO FLÓRIO, J.; PALERMO-NETO, J. Neuroendocrine, behavioral and macrophage activity changes induced by picrotoxin effects in mice. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 2, p. 300-8, 2008.

STODDARD, S. L.; BERGDALL, V.K.; TOWNSEND, D.W.; LEVIN, B.E. Plasma catecholamines associated with hypothalamically-elicited flight behavior. **Physiology & Behavior**, v. 37, n. 5, p. 709-15, 1986.

ALEXANDER, D.J.; ALDOUS, E.W.; FULLER, C.M. The long view : a selective review of 40 years of Newcastle disease research. **Avian Pathology**, v.41, n.4, p. 37-41, 2012.

ALEXANDER, D. J. Newcastle disease in the European Union 2000 to 2009. **Avian Pathology**, v.40, n.6, p.37-41, 2011.

THAXTON, P.; SADLER, C. R.; GLICK, B. Immune response of chickens following heat exposure or injections with ACTH. **Poultry Science**, v. 47, p. 264-266, 1968.

TSENG, L.P.; CHIOU, C.J.; DENG, M.C.; LIN, M.H.; PAN, R.N.; HUANG, Y.Y.; LIU, D.Z. Evaluation of encapsulated Newcastle disease virus liposomes using various phospholipids administered to improve chicken humoral immunity. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials**, v. 91, n. 2, p. 621-5, 2009.

UBABEF. **Relatório Anual 2012**. São Paulo: União Brasileira de Avicultura, p.1-57
VAN DIJK, A.; VELDHUIZEN, E. J.; HAAGSMAN, H. P. Avian defensins. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 124, n. 1-2, p. 1-18, 2012.

VAN MAREN, W. W. C. et al. Toll-like receptor signalling on Tregs: to suppress or not to suppress? **Immunology**, v. 124, n. 4, p. 445-52, ago. 2008.

VIZI, E. S.; ELENKOV, I. J. Nonsynaptic noradrenaline release in neuro-immune responses. **Acta Biologica Hungarica**, v. 53, n. 1-2, p. 229-44, 2002.

WEBSTER, J. I.; TONELLI, L.; STERNBERG, E. M. Neuroendocrine regulation of immunity. **Annual review of immunology**, v. 20, p. 125-63, 2002.

WILDER, R. L. Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. **Annual Review of Immunology**, v. 13, p. 307-38, 1995.

WRONA, D.; SUKIENNIK, L.; JURKOWSKI, .M.K.; JURKOWLANIEC, E.; GLAC, W.; TOKARSKI, J. Effects of amphetamine on NK-related cytotoxicity in rats differing in locomotor reactivity and social position. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 19, n. 1, p. 69-77, 2005.

YASUDA, M.; HORIUCH, H.; MATSUDA, J.; FURUSAWA, S. Immunobiology of chicken germinal center: II. Accumulation of apoptotic cells within the germinal center. **Cell and Tissue Research**, v. 314, n. 2, p. 215-21, 2003.

ZEFERINO, C. P.; KOMIYAMA, C.M.; FERNANDES, S.; SARTORI, J.R.; TEIXEIRA, P.S.; MOURA, A.S. Carcass and meat quality traits of rabbits under heat stress. **Animal**, v. 7, n. 3, p. 518-23, 2013.

ZHANG, Z. W.; LV, Z.H.; LI, J.L.; XU, S.W.; WANG, X.L. Effects of cold stress on nitric oxide in duodenum of chicks. **Poultry Science**, v. 90, n. 7, p. 1555-61, 2011.

ZHAO, F.Q; ZHANG, Z.W.; YAO, H.D; WANG, L.L.; LIU, T.; YU, X.Y.; LI, S.; XU, S.W. Effects of cold stress on mRNA expression of immunoglobulin and cytokine in the small intestine of broilers. **Research in Veterinary Science**, p. 1-10, 2013.

ZULKIFLIA, I.; DUNNINGTON, E.A.; GROSS, W.B.; SIEGEL, P.B. Inhibition of adrenal steroidogenesis, food restriction and acclimation to high ambient temperatures in chickens. **British Poultry Science**, v. 35, n. 3, 1994