WANDERLEY MORENO QUINTEIRO FILHO

Efeitos do estresse térmico por calor sobre os índices zootécnicos, a integridade do trato intestinal e a imunidade inata em frangos de corte

São Paulo
2008

WANDERLEY MORENO QUINTEIRO FILHO

Efeitos do estresse térmico por calor sobre os índices zootécnicos, a integridade do trato intestinal e a imunidade inata 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
2008

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.2082 Quinteiro Filho, Wanderley Moreno
FMVZ Efeitos do estresse térmico por calor sobre os índices zootécnicos, a integridade do trato intestinal e a imunidade inata em frangos de corte / Wanderley Moreno Quinteiro Filho. – São Paulo : W. M. Quinteiro Filho, 2008.
138 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2009.

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. Neuroimunomodulação. 3. Corticosterona. 4. Macrófagos. 5. Bem-estar animal.. I. Título.

ERRATA

QUINTEIRO-FILHO, W. M. **Efeitos do estresse térmico por calor sobre os índices zootécnicos, a integridade do trato intestinal e a imunidade inata de frangos de corte**. [Effect of heat stress on performance parameters, intestinal morphology and innate immunity of broiler chickens]. 2008. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Folha	Legenda	Linha	Lê-se	Leia-se
98	35	3	Linfo-plasmocitário	inflamatório
99	37, 38, 40 e 41	2	Presença de infiltrado linfo-plasmocitário na lamina própria (LP), caracterizando enterite discreta	Foco de infiltrado heterofílico na lâmina própria (LP) de uma vilosidade em um caso de enterite linfoplasmocítica discreta

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos do estresse térmico por calor sobre índices zootécnicos, integridade do trato intestinal e imunidade inata de francos de corte", protocolado sob o nº1053/2007, utilizando 800 (oitocentos) frangos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Palermo Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 10 de dezembro de 2008".

(We certify that the Research "Effect of heat stress on performance parameters, intestinal morphology and innate immunity in broiler chickens", protocol number 1053/2007, utilizing 800 (eight hundred) chickens, under the responsibility Prof. Dr. João Palermo Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 12/10/08.

São Paulo, 12 de dezembro de 2008

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

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

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

WANDERLEY MORENO QUINTEIRO FILHO

Titulo: Efeitos do estresse térmico por calor sobre os índices zootécnicos, a integridade do trato intestinal e a imunidade inata
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

Área de Concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____**Assinatura:**_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____**Assinatura:**_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____**Assinatura:**_____

Aos meus pais Wanderley e Eunice e as minhas irmãs Wanice e Gabriele, pelo amor, carinho e compreensão em todos os momentos. Obrigado por sempre acreditarem em mim.

A toda minha família, em especial meus avôs, por estarem sempre ao meu lado e compreenderem minhas ausências.

A Karen, pelo amor inquestionável, pelo apoio incondicional e pela incansável ajuda. Você faz minha vida mais feliz.

Ao Prof. Dr. João Palermo Neto, agora mais que um Mestre, um amigo, um exemplo de profissionalismo, dedicação e amor a ciência.

“Vivemos no mundo do irreal onde tudo o que vemos é somente uma sombra imperfeita de uma realidade mais perfeita.”

Platão (427 - 347 a. C)

AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Patologia, locais que aprendi a amar.

Ao Prof. João Palermo Neto por acreditar em mim e me orientar em mais esta jornada. Palavras são poucas para expressar minha gratidão nesses anos de trabalho.

Ao Prof. Antonio Piantino Ferreira, pela parceria e por estar sempre pronto a ajudar. Obrigado por abrir as portas do CEPA para nós.

A Prof. Dr. Lilian Rose Marques de Sá, pelos ensinamentos e por estar sempre disposta ajudar. Obrigado pelo auxilio na análise do trato intestinal.

Ao Prof. Dr. Jose Luiz Meurusse e ao Dr. Alexandre Martinewski pela paciência e apoio na elaboração e construção das salas climatizadas.

A Prof. Dr. Silvana Lima Gorniák, chefe do Programa de Patologia Experimental e Comparada, pela ótima convivência e pelo apoio nesses anos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Albuquerque que sempre esteve solícito com meus questionamentos.

Ao Prof. Claudio Alvarenga e a Dr. Priscila Viau do Laboratório de Dosagens Hormonais do VRA, pelas dosagens de corticosterona.

Ao Prof. Dr. Frederico Pinto, ao Prof. Dr. Luiz Carlos Sá Rocha e ao Daniel Cohn (Natô) pelos conselhos e pelas discussões enriquecedoras sobre a ciência e sobre a vida.

Aos técnicos do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do VPT, Priscila, Ricardo e Magali, pelo auxilio na realização dos experimentos.

A todos os funcionários do VPT, peças essenciais para o bom funcionamento deste Departamento, que direta ou indiretamente contribuíram com esta dissertação.

A todos os funcionários da biblioteca (FMVZ-USP), em especial a Helena e a Elza, sempre dispostas a ajudar.

Aos funcionários da Manutenção, em especial o Cabelo e o Damião, que estavam sempre prontos para solucionar os problemas técnicos das nossas instalações.

“Aguarde minha chegada ao raiar do quinto dia. Quando os primeiros raios de sol aparecerem, olhe para o leste”. Ataliba, muito obrigado!

Aos meus inesquecíveis amigos Mônica, Domenica, Milena, Viviane, Alison, e Felipe, por deixarem a execução e a discussão deste trabalho mais agradável. Sem vocês nada disso teria acontecido. Muito obrigado!!!

Ao Grupo de Neuroimunomodulação (VPT/FMVZ/USP) por todo o crescimento cientifico.

Ao Rodrigo por ajudar nos processos burocráticos e pela ótima convivência.

Ao grande amigo Dr. Dario Abbud Righi: um fim grandioso só existe quando se tem um inicio à altura.

Ao meu primo Dr. Fabio Ribeiro da Silva, por ter me apresentado a um grupo tão especial.

Aos meus amigos Fabio, Juliana, Felipe, Marcel, Teo, Marcelo, Cleber, Silvia, Marcio e Débora que sempre acreditaram no meu potencial.

As figuras ilustres da pós-graduação do VPT: Denise, Maria Isabel, Luciana Cunha, Renato, Ricardo, Antonio Carlos, Fabiana, Cris, Luciana Vismari, Luciana Lippi, Daniel, Altamir, Camila Moreira, Carol, Camila Lima, Mauricio, Tereza, Bruno, Heigde, Andréia, Bia, Daniel Sanches, Carol, Ana Paula, Isis, Elaine, Dudu, João Paulo, Glaucie, Portela ,Garé, Marina, Karin, Thiago e Eduardo (Marcio). Muito Obrigado!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (nº 04/14128-0 e n° 06/58677-2) e ao CNPq (nº 472082/2007-4) pelo suporte financeiro, que permitiu a execução deste estudo.

RESUMO

QUINTEIRO-FILHO, W. M. **Efeitos do estresse térmico por calor sobre os índices zootécnicos, a integridade do trato intestinal e a imunidade inata de frangos de corte**. [Effect of heat stress on performance parameters, intestinal morphology and innate immunity of broiler chickens]. 2008. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Os conceitos de bem-estar animal são uma realidade dentro da avicultura mundial. Sabe-se que aves estressadas apresentam diminuição no crescimento e na conversão alimentar, desajustes fisiológicos e hormonais, bem como aumento da suscetibilidade a doenças em decorrência de modificações induzidas pelo estresse na resposta imune. Além disso, eventos estressantes vêm sendo relacionados com distúrbios na integridade da microbiota intestinal. Nesse sentido, buscamos neste trabalho estudar os efeitos do estresse térmico por calor nas temperaturas de 26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC sobre os índices zootécnicos, a integridade intestinal e a imunidade inata de frangos de corte, correlacionado e discutindo os achados experimentais dentro de uma perspectiva neuroimune. Nossos resultados mostraram que o estresse por calor (31±1ºC e 36±1ºC) em frangos de corte: (**1**) diminuiu o ganho de peso e o consumo de ração, porém só observamos diminuição da conversão alimentar e da mortalidade nas aves submetidas ao estresse de 36±1ºC; (**2)** diminuiu o peso relativo da bursa de Fabrícius, porém apenas a temperatura de 36±1ºC diminuiu o peso relativo do timo; (**3)** diminuiu o *burst* oxidativo basal de macrófagos, porém apenas a temperatura de 31±1ºC foi capaz de diminuir o *burst* oxidativo dessa célula na presença de *S. aureus*. **(4**) aumentou os níveis séricos de corticosterona; e (**5**) observamos presença de discreta enterite caracterizada por aumento de infiltrado inflamatório linfo-plasmocitario na lamina própria do jejuno. Tomados em seu conjunto, os presentes dados permitem afirmar que o estresse térmico por calor tenha produzido alterações na atividade neuroimune dos frangos de corte modificando, nos mesmos a atividade do eixo HPA; essas alterações teriam influenciado o desempenho produtivo e a imunidade, propiciado do aparecimento de processos inflamatórios intestinais.

Palavras chaves: Estresse por calor. Neuroimmunomodulação. Corticosterona. Macrófagos. Bem-estar animal.

ABSTRACT

QUINTEIRO-FILHO, W. M. **Effects of heat stress on performance parameters, intestinal morphology and innate immunity in broiler chickens.** [Efeitos do estresse térmico por calor sobre os índices zootécnicos, a integridade do trato intestinal e a imunidade inata de frangos de corte]. 2008. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The concept of animal welfare is a reality in the world poultry industry. Stressed chickens present a decrease in growth performance and feed conversion, physiological and hormonal changes as well as an increased susceptibility to diseases. Recurrent changes induced by in stress in human and animals' immune functions were also reported after stress in poultry. Besides that, stressed events were reported to be related to intestinal microbiota integrity disturbances. In this sense, we evaluated the effects of heat stress (26±1ºC, 31±1ºC and 36±1ºC) on broiler chickens performance parameters, intestinal morphology and innate immunity, correlating and discussing the observed data under a neuroimmune perspective. Ours results showed the heat stress (31±1ºC and 36±1ºC) in broiler chickens (1) decreased body weight gain and feed consumption, however feed conversion and mortality decreased only in chickens submitted to 36±1ºC, (2) decreased the bursa of Fabricius relative weight in 31±1ºC and 36±1ºC, but thymus relative weight decreased only in the 36±1ºC stressed chickens, (3) decreased macrophage basal oxidative burst, however only the 31±1ºC heat stress decreased *S. aureus* – induced oxidative burst, (4) increased corticosterona serum levels, and (5) induced an enteritis characterized by increased presence of lymphocytes and plasmocytes within the lamina propria of jejunum. These obtained results suggested that heat stress-induced changes in broiler chickens were a consequence of a neuroimune activity disturbance, most probably, on animal's HPA axis activity. Thus, a possible increase in corticosterona serum levels induced by the heat stress underlay the effects of this stressor on birds' performance and immune function, leading to the appearance of intestinal histophatological signs of inflammation.

Key words: Heat stress. Neuroimmunomodulation. Corticosterone. Macrophages. Animal welfare

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliação dos índices zootécnicos em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida 59

Tabela 2 – Avaliação dos órgãos linfóides de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida 62

Tabela 3 – Avaliação dos índices zootécnicos em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (31±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida 65

Tabela 4 - Avaliação dos órgãos linfóides de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (31±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida 67

Tabela 5 – Avaliação dos índices zootécnicos em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida 69

Tabela 6 – Avaliação dos órgãos linfóides de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida 69

Tabela 7 – Intervalo de parâmetros hematológicos considerados normais de frangos (*Gallus gallus domesticus*) 72

Tabela 8 – Avaliação do hemograma em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida 72

Tabela 9 – Avaliação dos níveis séricos de corticosterona de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida..... 73

Tabela 10 – Avaliação da fagocitose de macrófagos peritoneais de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida..... 76

Tabela 11 – Avaliação da fagocitose de macrófagos peritoneais de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida..... 76

Tabela 12 – Avaliação do hemograma em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (31±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida 79

Tabela 13 – Avaliação dos níveis séricos de corticosterona de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (31±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida 79

Tabela 14 – Avaliação da fagocitose de macrófagos peritoneais de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (31±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida 81

Tabela 15 – Avaliação da fagocitose de macrófagos peritoneais de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (31±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida 81

Tabela 16 – Avaliação do hemograma em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida 84

Tabela 17 – Avaliação dos níveis séricos de corticosterona de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida 84

Tabela 18 – Avaliação da fagocitose de macrófagos peritoneais de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida 85

Tabela 19 – Avaliação da fagocitose de macrófagos peritoneais de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida 85

Tabela 20 – Comparação dos índices zootécnicos em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida 87

Tabela 21 – Avaliação dos órgãos linfóides de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida 90

Tabela 22 – Comparação do hemograma em frangos de corte, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida 92

Tabela 23 – Avaliação da Fagocitose de macrófagos peritoneais de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida 93

Tabela 24 – Avaliação da Fagocitose de macrófagos peritoneais de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida 93

Tabela 25 – Avaliação dos níveis séricos de corticosterona de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida 95

Tabela 26 – Avaliação histopatológica semi quantitativa do duodeno de frangos de corte submetidos ou não a estresse térmico de 26±1°C, 31±1°C ou 36±1°C, segundo relação vilo/cripta, comprimento de vilo, grau de hiperplasia da cripta, intensidade do processo inflamatório, infiltrados mononuclear, heterofilico, eosinofilico, numero de linfócitos intra-epiteliais em cada 100 enterócitos 135

Tabela 27 – Avaliação histopatológica semi quantitativa do jejuno de frangos de corte submetidos ou não a estresse térmico de 26±1°C, 31±1°C ou 36±1°C, segundo relação vilo/cripta, comprimento de vilo, grau de hiperplasia da cripta, intensidade do processo inflam inflamatório, infiltrados mononuclear, heterofilico, eosinofilico, numero de linfócitos intra-epiteliais em cada 100 enterócitos..... 136

Tabela 28 – Avaliação histopatológica semi quantitativa do ileo de frangos de corte submetidos ou não a estresse térmico de 26±1°C, 31±1°C ou 36±1°C, segundo relação vilo/cripta, comprimento de vilo, grau de hiperplasia da cripta, intensidade do processo inflamatório, infiltrados mononuclear, heterofilico, eosinofilico, numero de linfócitos intra-epiteliais em cada 100 enterócitos 137

Tabela 29 – Avaliação da fenotipagem de macrófagos peritoneais (KUL-01) colhidos de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida..... 138

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visão frontal das salas climatizadas. As setas indicam as duas salas usadas 45

Figura 2 - Computador e termômetro digital. A seta indica o termômetro digital 45

Figura 3 - Estrutura interna de uma das salas climatizadas 46

Figura 4 - Estrutura interna de uma das salas climatizadas 46

Figura 5 - Box com aves de 1 dia em uma das salas 46

Figura 6 – Esquema do protocolo experimental que foi utilizado nos experimentos 1, 2 e 3 58

Figura 7 – Avaliação do ganho de peso (g) em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida. Os dados representam a média ± desvio padrão de N=5 lotes/grupo, sendo cada lote=12 animais. ***p<0,001 em relação ao grupo controle. Teste de Mann-Whitney 59

Figura 8 – Avaliação do consumo de ração (g) em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida. Os dados representam a média ± desvio padrão de N=5 lotes/grupo, sendo cada lote=12animais; **p<0,01 em relação ao grupo controle. Teste de Mann-Whitney 60

Figura 9 – Avaliação da conversão alimentar em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida. Os dados representam a média ± desvio padrão de N=5 lotes/grupo, sendo cada lote=12animais; *p<0,05 em relação ao grupo controle. Teste de Mann-Whitney 60

Figura 10 – Efeitos do estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia sobre a porcentagem de sobrevida de frangos de corte. N=5 lotes/grupo, sendo cada lote=12animais. p<0,001 em relação ao grupo controle. Teste Log-rank (Mantel-Cox) 61

Figura 11 – Efeitos do estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia sobre o peso relativo (%) do timo de frangos de corte machos. Os dados representam a média ± desvio padrão. N=10 animais/grupo. ***p<0,001 em relação ao grupo controle. Teste “t” de Student 62

Figura 12 – Efeitos do estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia sobre o peso relativo (%) da bursa de Fabrícius de frangos de corte machos. Os dados representam a média ± desvio padrão. N=10 animais/grupo. ***p<0,001 em relação ao grupo controle. Teste “t” de Student 63

Figura 13 – Avaliação do ganho de peso (g) em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (31±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida. Os dados representam a média ± desvio padrão de N=5 lotes/grupo, sendo

cada lote=12 animais. **p<0,01 em relação ao grupo controle. Teste “t” de Student 65

Figura 14 – Avaliação do consumo de ração (g) em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (31±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida. Os dados representam a média ± desvio padrão de N=5 lotes/grupo, sendo cada lote=12 animais. **p<0,01 em relação ao grupo controle. Teste “t” de Student 66

Figura 15 – Efeitos do estresse térmico por calor (31±1ºC) do 35º ao 41º dia sobre o peso relativo (%) da bursa de Fabrícius de frangos de corte machos. Os dados representam a média ± desvio padrão. N=10 animais/grupo. ***p<0,001 em relação ao grupo controle. Teste “t” de Student..... 67

Figura 16 – Esquema do protocolo experimental que foi utilizado nos experimentos 4, 5 e 6 71

Figura 17 – Avaliação dos níveis séricos de corticosterona em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida. **p<0,01 em relação ao grupo controle, teste de Mann-Whitney. n=10 animais/grupo 73

Figura 18 – Citograma de leucócitos peritoneias de frangos de corte com 42 dias de vida, sendo que a área circulada em vermelho representa os macrófagos peritoneais marcados com KUL-01, utilizados nos experimentos 75

Figura 19 – Histograma de macrófagos peritonenais marcados com KUL-01 (PE) 75

Figura 20 – Burst Oxidativo induzido em macrófagos pela fagocitose de S. aureus. Os dados referem-se à intensidade de fluorescência, de frangos de corte submetidos ou não ao estresse térmico por calor (36±1ºC). N=10 animais/grupo. *p<0,05 em relação ao grupo controle. Teste “t” de Student..... 77

Figura 21 – Avaliação dos níveis séricos de corticosterona de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (31±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida. **p<0,01 em relação ao grupo controle, teste de Mann-Whitney. n=10 animais/grupo 80

Figura 22 – *Burst* Oxidativo basal em macrófagos peritoneais. Os dados referem-se à intensidade de fluorescência, de frangos de corte machos submetidos ou não ao estresse térmico por calor (31±1ºC). N=10 animais/grupo. *p<0,05 em relação ao grupo controle. Teste “t” de Student 82

Figura 23 – *Burst* Oxidativo induzido em macrófagos pela fagocitose de S. aureus. Os dados referem-se à intensidade de fluorescência, de frangos de corte machos submetidos ou não ao estresse térmico por calor (31±1ºC). N=10 animais/grupo. *p<0,05 em relação ao grupo controle. Teste de Mann-Whitney..... 82

Figura 24 – Efeitos do estresse térmico por calor (26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC) do 35º ao 41º dia sobre o ganho de peso (g) de frangos de corte machos. Os dados representam a média ± desvio padrão. N=5 lotes/grupo, sendo cada lote=12 animais. Números diferentes em so sobrescrito significam diferenças estatísticas

significantes (p<0,05). Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer 88

Figura 25 – Efeitos do estresse térmico por calor (31±1ºC e 36±1ºC) do 35º ao 42º dia sobre o consumo de ração (g) de frangos de corte machos. Os dados representam a média ± desvio padrão. N=5 lotes/grupo, sendo cada lote=12 animais. Números diferentes em sobrescrito significam diferenças estatísticas significantes (p<0,01). Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer 88

Figura 26 – Efeitos do estresse térmico por calor (26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC) do 35º ao 42º dia sobre a conversão alimentar (CA) de frangos de corte machos. Os dados representam a média ± desvio padrão. N=5 lotes/grupo, sendo cada lote=12 animais. Números diferente em sobrescrito significam diferenças estatísticas significantes (p<0,05). Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer 89

Figura 27 – Efeitos do estresse térmico por calor (26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC) do 35º ao 41º dia sobre o peso relativo (%) do timo de frangos de corte machos. Os dados representam a média ± desvio padrão de N=10 animais/grupo. Números diferentes em sobrescrito significam diferenças estatísticas significantes (p<0,01). Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer 90

Figura 28 – Efeitos do estresse térmico por calor (26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC) do 35 º ao 41º dia sobre o peso relativo (%) da bursa de Fabrícius de frangos de corte machos. N=10 animais/grupo Números diferentes em sobrescrito significam diferenças estatísticas signi significam diferenças estatísticas significantes (p<0,01). Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer 91

Figura 29 – *Burst* Oxidativo basal em macrófagos peritoneais. Os dados referem-se à intensidade de fluorescência de macrófagos provenientes de frangos de corte, submetidos ou não ao estresse térmico por calor (26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC). N=10 animais/grupo. Números diferentes em sobrescrito significam diferenças estatísticas significantes. Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer 94

Figura 30 – Burst Oxidativo induzido em macrófagos pela fagocitose de *S. aureus*. Os dados referem-se à intensidade de fluorescência de macrófagos provenientes de frangos de corte, submetidos ou não ao estresse térmico por calor (26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC). N=10 animais/grupo. Números diferentes em sobrescrito significam diferenças estatísticas significantes. *p<0,05 em relação aos grupos. Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer 94

Figura 31 – Avaliação dos níveis séricos de corticosterona de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida. N=10 animais/grupo. Números diferentes em sobrescrito significam diferenças estatísticas significantes. p<0,01 em relação aos grupos. Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn de comparações múltiplas 95

Figura 32 – Análise semiquantitativa da mucosa do jejuno de frangos de corte submetidos ou não ao estresse térmico de 26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC: analise do infiltrado inflamatório. N=10 animais/grupo. A linha interna representa a mediana e as marcas circulares os valores individuais. Números diferentes em sobrescrito significam diferenças estatísticas significantes (p<0,01). Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn de comparações múltiplas 97

Figura 33 – Análise semiquantitativa da mucosa do jejuno de frangos de corte submetidos ou não ao estresse térmico de 26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC: análise do infiltrado de mononucleares. N=10 animais/grupo. A linha interna representa à mediana e as marcas circulares os valores individuais. Números diferentes em sobrescrito significam diferenças estatísticas significantes (p<0,01). Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn de comparações múltiplas 97

Figura 34 – Análise semiquantitativa da mucosa do jejuno de frangos de corte submetidos ou não ao estresse térmico de 26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC: analise de heterófilos. N=10 animais/grupo. A linha interna representa à mediana e as marcas circulares os valores individuais. Não obtivemos diferenças estatísticas entre os grupos (p>0,05). Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn de comparações múltiplas 98

Figura 35 – Fotomicrografia do jejuno de frangos de corte controle, com 42 dias de vida. Estrutura de vilos e criptas dentro da normalidade, e ausência de infiltrado linfo-plasmocitario na lamina própria. HE, 40x 98

Figura 36 – Fotomicrografia do jejuno de frangos de corte controle, com 42 dias de vida. Estrutura de vilos e criptas dentro da normalidade, e ausência de infiltrado linfo-plasmocitário na lamina própria (LP). HE, 200x 99

Figura 37 – Fotomicrografia do jejuno de frangos de corte submetidos a estresse de 31±1°C, com 42 dias de vida. Enterite discreta. Estrutura de vilos e criptas dentro da normalidade, e presença de infiltrado linfo-plasmocitário na lamina própria (LP). Seta indica heterófilo na lamina própria (LP). HE, 200x 99

Figura 38 – Fotomicrografia do jejuno de frangos de corte submetidos a estresse de 36±1°C, com 42 dias de vida. Enterite discreta. Estrutura de vilos e criptas dentro da normalidade, e presença de infiltrado linfo-plasmocitario na lamina própria. Notar linfócitos intra-epiteliais. HE, 200x 99

Figura 39 – Fotomicrografia do jejuno de frangos de corte controles. Estrutura normal de lamina própria. Notar linfocitos intraepitelias HE, 400x 99

Figura 40 – Fotomicrografia do jejuno de frangos de corte submetidos a estresse de 31±1°C. Enterite discreta, infiltrado inflamatório linfo-plasmocitario observado na lamina própria. HE, 400x 99

Figura 41 – Fotomicrografia do jejuno de frangos de corte submetidos a estresse de 36±1°C. Enterite discreta, infiltrado inflamatório linfo-plasmocitario observado na lamina própria. HE, 400x 99

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH – Hormônio adenocorticoprópico

CRH – Hormônio Liberador de Corticotropina

FSC – Feixe óptico de luz que indica o tamanho da célula

HPA – Hipofise – pituitária – adrenal

Ig - Imunoglobulina

IL – Interleucina

LPS - Lipopolissacarideo

NK – *natural killer*

PI – Iodeto de Propídio

SAPI – *Staphylococcus aureus*

SCF – *stem cell factor*

SI – Sistema Imunológico

SNA – Sistema Nervoso Autônomo

SNAP – Sistema nervoso autônomo parassimpático

SNAS – Sistema nervos autônomo simpático

SNC – Sistema Nervoso Central

SSC – feixe óptico de luz que indica a granulosidade da célula

T_3 – Triiodotironina

T_4 – Tetraiodotironina (tiroxina)

TNF-α – fator de necrose tumora - α

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 22

2 REVISÃO DE LITERATURA 24
2.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO 24
2.2 ESTRESSE TÉRMICO E RESPOSTA IMUNE EM AVES 35

3 OBJETIVOS 42
3.1 OBJETIVOS GERAIS 42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 42

4 MATERIAIS E MÉTODOS 44
4.1 ANIMAIS 44
4.2 CORANTES CELULARES 47
4.3 REAGENTES E SOLUÇÕES 47
4.4 PROCEDIMENTOS 48
4.4.1 ESTRESSE TÉRMICO 48
4.4.2 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO PRODUTIVO DAS AVES 49
4.4.3 SELEÇÃO AMOSTRAL 49
4.4.4 DETERMINAÇÃO DE HEMOGRAMA 50
4.4.5 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA 50
4.4.6 COLETA DE MATERIAL PARA EXAMES HISTOPATOLÓGICOS 51
4.4.7 ANÁLISE DA INTEGRIDADE DO TRATO INTESTINAL 51
4.4.8 ANÁLISE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS 53
4.4.9 AVALIAÇÃO DA FAGOCITOSE E DO *BURST* OXIDATIVO DE MACRÓFAGOS POR CITOMETRIA DE FLUXO 54
4.4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA 56

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS 57
5.1 EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES ZOOTÉCNICOS, DO PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS LINFÓIDES E DA INTEGRIDADE DO TRATO GASTROINTESTINAL EM FRANGOS DE CORTE, SUBMETIDOS OU NÃO A ESTRESSE TÉRMICO POR CALOR (36±1ºC) DO 35º AO 41º DIA DE VIDA 57
5.2 EXPERIMENTO 2 – AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES ZOOTÉCNICOS, DO PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS LINFÓIDES E DA INTEGRIDADE DO TRATO GASTROINTESTINAL EM FRANGOS DE CORTE, SUBMETIDOS OU NÃO A ESTRESSE TÉRMICO POR CALOR (31±1ºC) DO 35º AO 41º DIA DE VIDA 63
5 3 EXPERIMENTO 3 – AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES ZOOTÉCNICOS, DO PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS LINFÓIDES E DA INTEGRIDADE DO TRATO GASTROINTESTINAL EM FRANGOS DE CORTE, SUBMETIDOS OU NÃO A ESTRESSE TÉRMICO POR CALOR (26±1ºC) DO 35º AO 41º DIA DE VIDA 68
5.4 EXPERIMENTO 4 – AVALIAÇÃO DO HEMOGRAMA, DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA E DA ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM FRANGOS DE CORTE COM 42 DIAS DE VIDA, SUBMETIDOS OU NÃO A ESTRESSE TÉRMICO POR CALOR (36±1ºC) DO 35° AO 41° DIA DE VIDA 70
5.5 EXPERIMENTO 5 – AVALIAÇÃO DO HEMOGRAMA, DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA E DA ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE FRANGOS DE CORTE COM 42 DIAS DE VIDA, SUBMETIDOS OU NÃO A ESTRESSE TÉRMICO POR CALOR (31±1ºC) DO 35° AO 41° DIA DE VIDA 78

5.6 EXPERIMENTO 6 – AVALIAÇÃO DO HEMOGRAMA, DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA E DA ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS EM FRANGOS DE CORTE COM 42 DIAS DE VIDA, SUBMETIDOS OU NÃO A ESTRESSE TÉRMICO POR CALOR (26±1ºC) DO 35° AO 41° DIA DE VIDA 83
5.7 COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS NAS TEMPERATURAS 36±1ºC, 31±1ºC E 26±1ºC 86
6 DISCUSSÃO 101

7 CONCLUSÕES 117
7.1 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS 117
7. 2 CONCLUSÃO GERAL 118

REFERÊNCIAS 120

APÊNDICES 135

1 INTRODUÇÃO

As interações bi-direcionais entre o Sistema Nervoso Central (SNC) e o Sistema Imune (SI) vêm representando uma rica fonte de pesquisas inter-disciplinares que ganharam maior "*status*" após o efetivo estabelecimento da área de pesquisa em neuroimunomodulação ou psiconeuroimunologia (BLALOCK, 1989; BESEDOWSKY; DEL REY; 1996; LICINIO; FROST, 2000; PALERMO-NETO, 2003; GOEHLER; LYTE; GAYKEMA, 2007; ALVES; PALERMO-NETO, 2007). Sabe-se que células do sistema imune, como os macrófagos, liberam Interleucina-1β, Interleucina-6 e Fator de Necrose Tumoral-α, que atuando no SNC provocam alterações neuroquímicas e comportamentais como, por exemplo, o comportamento doentio (JOHNSON, 1998; CONNOR et al., 2003; COHN et al., 2006). Da mesma forma, sabe-se que alterações induzidas na atividade do SNC pelo estresse, bem como por fármacos que atuam no SNC como, por exemplo, os benzodiazepínicos, a anfetamina e alguns praguicidas como os piretróides do tipo II, modificam a função imune (SILVA et al., 2000; ESKANDARI; STERNBERG., 2002; PALERMO-NETO et al., 2002; RIGHI; PALERMO-NETO, 2003; RIGHI; PALERMO-NETO, 2005; GLAC et al., 2006; LIGEIRO-OLIVEIRA et al., 2008).

Nos últimos anos, a influência do estresse sobre a função neuroimune vem sendo extensivamente estudada. Ao longo da evolução, todas as formas de vida têm desenvolvido mecanismos para contrapor os efeitos do estresse em suas vidas, uma vez que é notório serem esses efeitos danosos para os indivíduos. De fato, se aceita que animais expostos a situações adversas sofrem com os efeitos do estresse, por elas geradas desenvolvendo patologias similares àquelas apresentadas pelos seres humanos que experimentam idênticas situações. Essas alterações podem levar os animais de produção, por exemplo, a um atraso em seu crescimento, a prejuízos reprodutivos e até mesmo à morte.

(MOBERG, 1996; MOBERG, 2000). O reconhecimento dos efeitos nocivos do estresse têm resultado, entre outros, em estudos ligados às áreas de ambiência e bem-estar animal.

Diversos experimentos conduzidos com animais de laboratório têm mostrado que o estresse causa modificações na resposta imune, alterando a atividade de linfócitos Th1 e Th2, diminuindo a atividade de macrófagos e de células NK. Esse fato tem sido explicado pelos aumentos induzidos pelo estresse nos níveis de ACTH e de corticosterona que inibem a transcrição de inúmeras citocinas (IWAKABE et al., 1998; KIECOLTGLASER et al., 2001; PALERMO-NETO, 2003). Podem, também, ser conseqüência de alterações, entre outras, na atividade do Sistema Nervoso Autônomo Simpático, com conseqüente liberação de adrenalina e noradrenalina (ELENKOV et al., 2000; NANCE; SANDERS, 2007).

Nesse contexto, um tipo particular de estressor ambiental relevante à avicultura é o estresse térmico. A alta temperatura ambiente pode causar transtornos para a produção de frangos como, por exemplo, diminuição no crescimento e na conversão alimentar, desajustes fisiológicos, hormonais (aumento dos níveis séricos de corticosterona e de catecolaminas) e moleculares, bem como aumento da suscetibilidade às doenças e/ou de mortalidade (FRANCI et al., 1994; GERAERT et al., 1996; KHAJAVI et al., 2003; MUJAHID et al., 2007).

Deste modo, pelo fato de o Brasil ser um dos maiores produtores de frango de corte do mundo, requerendo constante busca por novas tecnologias e soluções para sua produção, e considerando-se ser o estresse por calor um dos maiores problemas dessa produção, idealizamos esse estudo para analisar alguns efeitos do estresse por calor em frangos de corte sobre a atividade do eixo neuroimune de aves; mais especificamente, sobre os índices zootécnicos, os órgãos linfóides, o hemograma, os níveis de séricos corticosterona, a integridade do trato intestinal e a atividade de macrófagos peritoneais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neuroimunomodulação

Evidências convergentes dos campos da psicologia, neurobiologia e imunologia vêm demonstrando que o sistema imune não é regulado de maneira exclusivamente autônoma, mas que é influenciado por fatores internos ou externos direcionados pelo sistema nervoso central (SNC) (MADDEN; FELTEN, 1995). O sistema imune (SI), por sua vez, através de produtos de secreção celular como, por exemplo, de interleucinas e prostaglandinas, modula a atividade do SNC (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996; GOEHLER et al., 2007). Embora de conhecimento amplo, foi somente nas últimas duas décadas que se começou a dar maior importância científica ao estudo destas interações neuroimunes, já que até então prevalecia uma tendência de setorialização das abordagens experimentais que se faziam quer no SNC quer no SI (CONTI, 2000; BESEDOVSKY; DEL REY, 2007).

A neuroimunomodulação foi conceituada, inicialmente, como a área de estudo que avaliava as influências exercidas pelo sistema nervoso sobre a resposta imune (REICHLIN, 1993). Atualmente, ela é definida como o estudo das inter-relações existentes entre o SNC e o SI. O termo inter-relações foi empregado porque se sabe, hoje, serem estas relações bidirecionais (COHEN; HERBERT, 1996; ALVES; PALERMO-NETO, 2007).

A influência da atividade do sistema neuroendócrino sobre o sistema imune foi explicada magistralmente por Hans Seyle em um artigo que se tornou um marco na história do estudo do estresse (SEYLE, 1936; REICHE; NUNES; MORIMOTO, 2004). Seyle descreveu o desenvolvimento de uma síndrome decorrente da exposição de um animal a um conjunto muito diversificado de estímulos nocivos que incluía exposição ao frio, injúria tecidual,

excesso de exercícios e intoxicações. Recorde-se, que os achados de necroscopia característicos dessa síndrome incluíam hipertrofia das glândulas adrenais, aparecimento de úlceras gástricas e, curiosamente para a época, atrofia de órgãos linfóides como timo, baço e linfonodos. Como tais achados eram independentes do estímulo empregado, Seyle concluiu que representavam uma resposta orgânica à injúria denominando-os coletivamente de 'síndrome de adaptação geral', posteriormente chamada de estresse. Dessa forma, ele mostrou, de forma pioneira, a possível modulação do SNC sobre o SI. Mais adiante, Wexler, Dolgin e Tryczynski (1957) mostraram ocorrência de uma ativação do eixo hipotálamo pituitária adrenal (HPA) após a administração e uma endotoxina bacteriana, constatando uma possível modulação do SI sobre o SNC.

Dos trabalhos de Seyle (1955), nasceram dois conceitos fundamentais sobre o estresse: 1) a resposta aos estressores tinha caráter adaptativo e representava uma tentativa do organismo de acomodar-se a uma nova situação e, 2) ela não dependia do estímulo, isto é, era estereotipada (SEYLE, 1955). Como essa síndrome era gerada por estímulos físicos e psicológicos e como tinha decorrências comportamentais e endócrinas, incluindo-se aqui a influência nervosa sobre a atividade de órgãos linfóides e sobre células imunes, parece natural supor que o SNC e o SI interagiriam na preparação dos organismos para acomodá-los a mudanças impostas pelo estressor. Essa noção se confirmaria, tendo-se como certo, nos dias atuais, que diversos estímulos provenientes do SNC são capazes de modular a resposta imune inata ou adaptativa. O sistema endócrino e, muito especialmente, o eixo HPA, é um dos responsáveis por vários dos elos de ligação entre estes dois sistemas (LICINIO; FROST, 2000). Participam ainda dessa resposta, endorfinas, tireotrófinas, prostaglandinas, hormônio do crescimento e, principalmente o Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNAS) e Parassimpático (SNAP) (ALVES; PALERMO-NETO, 2007).

Dentro desse enfoque, faz-se necessário uma definição da palavra estresse, uma vez que a mesma apresenta diversos significados. Por várias vezes essa palavra é colocada para se referir a uma condição que provocou a resposta (estímulo estressor ou simplesmente estressor), ou para se referir às mudanças na homeostasia do organismo induzidas por uma condição externa (reposta de estresse propriamente dito). É relativamente comum ver o uso da palavra estresse empregado tanto para se referir ao estímulo estressor como à resposta induzida pelo estímulo estressor. Assim, para o propósito desta revisão de literatura um estressor é qualquer estímulo (psicológico, ambiental, comportamental ou imunológico) capaz de provocar uma resposta fisiológica de estresse, que pode ser mensurada pelo aumento dos níveis de glicocorticóides (MCEWEN, 2005). As conseqüências desta resposta são geralmente adaptativas à curto prazo (DHABHAR; MCEWEN, 1996, 1997), porém podem ser prejudiciais quando o estímulo estressor se mantém por um período crônico (DHABHAR; MCEWEN, 1997; MCEWEN, 1998).

Salientando a idéia de uma resposta coordenada do organismo frente a um estimulo estressor, o modelo clássico de estresse animal sugere uma resposta biológica ao estresse a partir de três estágios gerais: 1-) reconhecimento do estimulo estressor; 2-) defesa biológica contra o estimulo estressor; e 3-) conseqüências da resposta ao estressor (MOBERG, 2000). A resposta ao estressor começa com a percepção pelo SNC de uma ameaça potencial à homeostase. Uma vez que o SNC "percebe" uma ameaça, o organismo desenvolve uma resposta biológica ou defesa que consiste em uma combinação de quatro respostas gerais de defesas biológicas: resposta comportamental, resposta autonômica, resposta neuroendócrina e resposta imunológica (MOBERG, 2000).

De fato, o estresse pode estimular uma resposta orgânica coordenada; porém, Dhabhar e McEwen em 1997 propõem que a resposta ao estresse e suas repercussões na função imune deva ser olhada num contexto de *Stress Spectrum*. Assim, uma das regiões deste espectro de

estresse é caracterizada pelo – *Eustress*, ou seja, condições de um estresse agudo, de curta duração ou fisiológicamente adaptável, que resulta na manutenção fisiológica das funções imunes. Segundo os autores, uma característica importante do *eustress* é a rápida resposta fisiológica de estresse montada na presença de um estressor, seguida de um rápido "desligamento" da resposta uma vez retirado o estímulo. Na outra ponta do espectro do estresse está caracterizado o *Distress*, ou seja, condições de estresse crônico, repetido, ou que provoquem exaustão fisiológica, que têm como resultante, entre outras condições, imunossupressão. A característica importante do *distress* é que a resposta fisiológica ou pode persistir por um longo tempo após a retirada do estímulo estressor ou pode ser repetidamente ativada e resultar em um aumento total e integrado da exposição do organismo aos hormônios do estresse. Além disso, o modelo do *Stress Spectrum* também propõe que entre a região do *eustress* e do *distress* existe uma área de *Resilience* – Resiliência, que é definida como a habilidade que tem os organismos de sobreviver por longo período de tempo a condições de adversidade.

Assim, McEwen e seus colaboradores desenvolveram uma nova proposta para o conceito de estresse, a Alostasia "*The concepts of allostasis"* (DHABHAR; MCEWEN, 1997). Segundo os autores, esta terminologia permite aceitar as ambigüidades existentes no tradicional conceito de estresse. Segundo esse novo conceito, alostasia é definida como um processo adaptativo criado para manter, ativamente, a estabilidade orgânica por meio de sucessivas mudanças (STERLING, 1988; MCEWEN, 2005).

A alostasia é importante tanto nos eventos imprevisíveis, como por exemplo conflitos pela hierarquia social dentro de um grupo, competição por recursos, tempestade e desastres naturais, como também em eventos previsíveis, como mudanças sazonais que desencadeiam a migração e a hibernação. A idéia central é que existe um custo adicional para o organismo se recuperar caso os mediadores da alostasia (hormônios adrenais, neurotransmissores, citocinas,

entre outros) sejam liberados freqüentemente ou sejam administrados de forma ineficiente, sendo este custo designado de “carga alostática” (MCEWEN, 2000, 2005).

Grande parte da influencia do SNC sobre o SI é exercida pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA). O hipotálamo apresenta diversas conexões neurais como o sistema límbico, que esta envolvido nos processos de adaptação e nas respostas neuro-endocrinas e emocionais ao estresse. O hipotálamo recebe informações da periferia, integra-as com o ambiente interno, e promove o necessário ajuste de certas funções, como por exemplo, do funcionamento do Sistema Nervoso Simpático (SNAS) e das secreções hormonais endocrinas, como de ACTH (ELENKOV et al., 2000)

Sabe-se que os sistemas nervoso e endócrino atuando em conjunto regulam as funções imunes por meio de mecanismos aditivos ou sinérgicos, e até mesmo antagônicos. A natureza dessa interação é exemplificada, como já comentado, pelas habilidades que têm o SNC de produzir neurotransmissores e neuropeptídeos, que modificam a atividade do eixo HHA e do SNAS e, assim a atividade das células imunes (GANEA, 1996; GARZA; CARR, 1997; REUL et al., 1998; ESKANDARI; STERNBERG, 2002).

O principal “desencadeador” dos processos imunoregulatórios regulados pelo eixo HPA é o Hormônio Liberador de Corticotropina (CRH). O CRH é secretado pelo núcleo paraventricular do hipotálamo e estimula a expressão e liberação do ACTH pela porção anterior da glândula hipófise (SCOTT; DINAN, 1998); este hormônio alcança as adrenais através da circulação sanguínea, induzindo a expressão e a liberação de glicocorticóides. Deste modo, o produto final desta cascata é o cortisol em humanos e em hamsters, e a corticosterona em aves e em outros animais (MASHALY et al., 1998; LAWRENCE; KIM, 2000). Estes glicocorticóides, sabidamente regulam os processos inflamatórios/imunológicos (MCEWEN et al., 1997). Sabe-se, que os níveis de CRH são positivamente regulados, entre outros, pelos sistemas serotominérgicos, colinérgicos e catecolaminérgicos centrais

(CALOGERO; GALLUCCI; BERNARDINI, 1988; CALOGERO; BERNARDINI; MARGIORIS, 1989; CALOGERO; BAGDY; SZEMEREDI, 1990). Assim, uma alteração nos níveis e "turnover" destes neurotransmissores induzida pelo estresse, como por exemplo, pelo calor ambiental, poderia justificar as alterações comportamentais e endócrinas indicativas de estresse (GARRIGA et al., 2006; LIN et al., 2006).

Franci et al. (1996) analisaram os efeitos do estresse térmico prolongado e da restrição alimentar sobre o consumo de alimento, a proliferação de linfócitos e a síntese de anticorpos, em coelhos machos. Os animais do grupo que recebeu estresse térmico foram mantidos por 24 dias em uma temperatura média de 33,5 °C. Já os animais com restrição alimentar foram mantidos à temperatura de 18°C e, finalmente os do grupo controle foram também mantidos a 18°C com alimentação *ad libitum.* Mostrou-se que ambos estressores afetaram o funcionamento das células imunes, diminuindo a capacidade de proliferação das células mononucleares do sangue periférico, e inibindo a diferenciação de linfócitos B em células secretoras de anticorpos.

Palermo-Neto, Massoco e Robespierre de Souza, (2003), relataram alterações comportamentais e imunológicas produzidas por estresse físico e psicológico em camundongos adultos. Neste trabalho os autores mostraram que um estresse psicológico, gerado pelo ato de observar outro animal receber um choque inescapável nas patas, produzia respostas estressantes em tudo similares àquelas geradas pelo choque inescapável. Tanto o animal que recebia o choque inescapável na pata como o que presenciava a estimulação aversiva apresentaram uma redução da resistência ao crescimento do tumor ascítico de Ehrlich, que foi avaliado através do número de células tumorais e do volume do fluído ascítico. Estes mesmos autores observaram, também, nesses animais uma redução dos índices de espraiamento e de fagocitose de macrófagos peritoneais e uma diminuição da atividade locomotora dos mesmos no campo aberto (PALERMO-NETO; MASSOCO; ROBESPIERRE

DE SOUZA, 2003). Na mesma direção mostrou-se, também que camundongos estressados durante a fase pré-natal apresentaram aumento dos níveis de ansiedade, diminuição dos índices de espraiamento e fagocitose por macrófagos peritoneais e, também, aumento do crescimento do Tumor de Ehrlich em suas formas sólida e ascítica (PALERMO NETO; MASSOCO; FAVARE, 2001).

Ainda nessa linha de trabalhos, alguns autores mostraram que camundongos submetidos a um ciclo de estresses crônicos tinham menor capacidade de produzir IFNy a partir de leucócitos (KIANK; DAESCHLEIN; SCHUETT, 2008). Nesta condição, bactérias da microbiota dos camundongos, penetravam através das barreiras intestinais seguindo uma direção aos órgãos linfóides e fígado, podendo até mesmo atingir os pulmões causando pneumonia persistente; relacionaram, portanto, a migração de bactérias com disfunções imunes ao nível da barreira intestinal e de todo sistema envolvido com o processo desta migração (KIANK; DAESCHLEIN; SCHUETT, 2008).

O estudo da neuroimunomodulaçao em animais de companhia, silvestres, ou, em especial, nos de produção, ainda não acompanha a grandeza dessa linha de pesquisa. Poucos trabalhos têm sido realizados a fim de compreender as relações entre o SN e o SI nos animais domésticos e selvagens. Alguns autores, como Morrow-Techs et al. (1994), em estudos feitos com suínos, mostraram que as interações sociais entre dominantes e submissos podem afetar as funções imunológicas dos animais. Em geral, dominantes e submissos tiveram alterações imunes (número elevados de neutrófilos e diminuição da produção de anticorpos) quando comparados com os porcos que não haviam estabelecido relações de dominância. Podemos, ainda, interpretar alguns dados provenientes de animais silvestres como decorrentes de alterações na esfera neuro-endocrino-imune. O cativeiro por si só é um fator estressante para os animais, sendo que algumas espécies desenvolvem a síndrome de má adaptação, onde os animais iniciam um processo de anorexia que podem levar-los à morte (FEDULLO, 2001).

Em animais de zoológico como em elefantes cativos, o estresse pode levar ao aparecimento de comportamentos estereotipados e repetitivos como o balançar constante da cabeça. Em pandas mantidos em cativeiro em zoológicos foi observado que os animais apresentaram prejuízos na função reprodutiva devido ao excesso de barulho. Os primatas do gênero Alouatta sp tem sido mantidos com dificuldades em cativeiro devido à má adaptação da espécie que desenvolve quadros de anorexia, inanição, úlceras gástricas, infecções secundárias e morte. Baixas taxas reprodutivas devido ao estresse crônico também foram registradas nesta espécie. Outros primatas apresentaram comportamentos estereotipados e automutilação em virtude de um ambiente artificial e pouco atrativo. Nesse sentido, o aumento de comportamentos auto-direcionados (catação, toque, coçar) em primatas não-humanos serve como indicador de estresse e ansiedade (HOHENDORFF, 2003).

Os estudos com estresse têm também grande importância quando se trata de animais de produção, pois a grande competição comercial e a crescente preocupação com o bem-estar animal tornam necessário que se estabeleçam padrões mínimos de ambiência e bem-estar que têm sido regulados por leis no Brasil e em outros países. Sabemos, nesse sentido, que nosso país tem destaque no mercado internacional de produtos de origem animal, e que têm sido cada vez maiores as exigências destes países com a qualidade dos produtos, com o meio ambiente e com o bem estar dos animais. De fato, a produção de uma carne com qualidade superior está relacionada, também, à redução dos níveis de estresse e/ou à aniquilação do mesmo. Esse desafio implica na atuação do médico veterinário que deve garantir o bem-estar dos animais.

De tudo que foi exposto, percebe-se que a existência de interações neuroendocrinoimunologicas em mamíferos, em comparação com outras classes animais, já está bem estabelecida. Entretanto, estas inter-relações não têm sido freqüentemente analisadas em aves. Este fato é estranho uma vez que também nesta espécie, mais

especificamente em frangos, foi constatada a existência de receptores para uma série de neurotransmissores em células do sistema imune, bem como a presença, em concentrações farmacológicas, desses neurotrasmissores em órgãos linfóides (GRAY et al., 1991; GARSSADI et al., 1994). Estes fatos explicariam, em parte, a influência do SN sobre a imunidade das aves. No sentido inverso, sabe-se que as respostas imunes provocam alterações no SNC. Aves com infecções leves por *Bordetella avium* apresentam alterações de parâmetros neuroquímicos como, por exemplo, dos níveis de serotonina, de dopamina e de noraepinefrina (analisados por HPLC- *High-performance liquid chromatography*) tanto no cérebro como no baço, no timo e na bursa de Fabricius (EDENS et al., 1987a, b). Além disso, animais doentes ingerem menos alimento, sendo que se sabe estar este comportamento relacionado à liberação pelo SI de citocinas inflamatórias, como IL-1β, IL-6 e TNF-α que, atuando em centros responsáveis pelo controle da fome no SNC, produzem comportamento doentio e redução da ingestão de alimentos (JOHNSON, 1998).

Outros pesquisadores vêm mostrando as relações existentes entre os sistemas Imune, Nervoso e Endócrino em animais de produção. Heckert et al. (2002) mostraram que frangos submetidos a uma superlotação (aumento de densidade populacional) apresentaram uma diminuição da atividade imune. Observaram também que o aumento da densidade populacional (20 aves/m²) diminuiu significantemente o peso total e o peso relativo da bursa de Fabricius, um dos mais importantes órgãos linfóides de uma ave (comparados ao grupo controle 10 aves/m²). Mas não é só na produção de aves que se pode notar a existência de relações neuroimunologicas. Bovinos, ovinos e bubalinos, quando submetidos a uma situação estressante, apresentam queda nos parâmetros produtivos e imunológicos (SEVI et al., 2001; KHONGDEE et al., 2006; GUPTA et al., 2007) Na produção leiteira, animais mantidos com nebulização e/ ou outros métodos que minimizam o estresse por calor, têm mostrado aumento de produtividade e maior eficiência reprodutiva (KHONGDEE et al., 2006). Em suínos, o

estresse por isolamento social alterou o comportamento (diminuindo vocalização e locomoção), e as concentrações basais de ACTH e de cortisol, e reduziu a função imune, diminuindo a proliferação de linfócitos a estímulos apropriados. (KANITZ et al., 2004). Desta forma, alterações que envolvam os sistemas neuroendocrinoimune, podem representar problemas para a saúde e a produtividade de suínos comerciais (KANITZ et al., 2004).

Foi, também, relatada a participação do SNAS na regulação da atividade do sistema imune em aves (GHENG, 2006). Nesse trabalho, o autor utilizando um agonista de receptores α-2 adrenérgicos, a Clonidina, usado para tratamento de ansiedade, mostrou ter ele um efeito estimulante sobre o sistema imune, melhorando a resposta inflamatória por atuar diretamente no SI ou via eixo HPA (CHENG, 2006). Assim, este agonista foi capaz de aumentar as concentrações de IgG e as proporções de células B e de linfócitos $CD8^{+}$, o que levou o autor a sugerir que o SNAS e o eixo HPA estariam envolvidos com a regulação da resposta imune de frangos. Outro estudo que reforça as relações neuroendocrinoimunológicas, esta relacionado com a inoculação de LPS (lipopolissacarideo) que aumenta os níveis de corticosterona, a temperatura corporal, produz diminuição da ingestão alimentar e comportamento doentio em frangos jovens (SELL et al., 2003).

Nesse sentido, é relevante comentar ainda que o estresse, se mantido por tempo prolongado, produz lesões na mucosa do trato gastrintestinal (COSEN-BINKER et al., 2004; MARTINDALE, 2005). Lesões como essas podem prejudicar a digestão dos nutrientes bem como a homeostase da microbiota indígena local do trato Intestinal acarretando perdas de absorção, redução do ganho de peso e aumento do consumo alimentar (ALLEN et al., 1998; KORVER, 2006; SIFRI, 2006). De fato, agentes que desequilibram o *turnover* celular da mucosa do trato gastrintestinal de aves têm a capacidade de interferir com a capacidade de digestão e de absorção de nutrientes (MACARI et al., 2005). Tem sido relatado também que lesões ulcerativas, enterites inespecíficas e lesões causadas por microorganismos induzem

alterações funcionais no intestino de aves, prejudicando os processos absortivos de nutrientes. Segundo alguns autores, a adrenalina e a noradrenalina interferem com a absorção de nutrientes, com a secreção de água e de sais pelo intestino (HUBEL et al., 1985) e com os mecanismos de transporte celular (ANDO; KONDO, 1993; TRISCHITTA et al., 1999). É, assim, lícito supor que os efeitos do estresse sobre a integridade da mucosa intestinal sejam conseqüência de ações direta de fatores regulatórios locais (produzidos por células enteroendócrinas) ou indireta, ligadas à atividade do eixo HPA, do SNA ou a peptídeos endógenos. De fato, ausência de hormônios da adrenal pode causar atrofia do epitélio intestinal, com diminuição da produção de fatores celulares epiteliais, como SCF, IL-7 e IL-15; este fato passa a ser critico no desenvolvimento, ativação e sobrevida de linfócitos intra-epiteliais intestinais (WATANABE et al., 1995; FUJIHASHI et al., 1996; INAGAKI-OHARA et al., 1997; JARRILO-LUNA et al., 2008).

Neste contexto, sabe-se que o frango de corte é hoje uma das espécies de animais de criação com maior eficiência nutricional e rápido desenvolvimento corporal. No Brasil, a avicultura foi uma das atividades agropecuárias de maior desenvolvimento nas ultimas décadas. Este progresso, tanto no numero de frangos abatidos como no de ovos produzidos, tem possibilitado à indústria avícola um notável potencial para prover os consumidores finais, de uma fonte protéica saudável e de custo baixo. No entanto, a criação de frangos de corte continua representando desafios na medida em que a atividade atinge novos e mais altos patamares de produtividade. Nos países tropicais, como o Brasil, fatores ambientais como a alta temperatura e a alta umidade dentro do galpão despontam como limitantes à ótima produtividade (FURLAN, 2006).

2.2 Estresse térmico e resposta imune em Aves

Sabe-se que estressores ambientais, nutricionais, físicos, sociais ou fisiológicos estão envolvidos com o bem estar e o desenvolvimento animal (ALTAN et al., 2003). Neste sentido, o estresse provocado pelo excesso de calor é um dos maiores responsáveis por perdas na criação intensiva de frangos de corte, principalmente quando ocorre próximo ao momento do abate (FURLAN, 2006). De fato, a zona de conforto térmico dos frangos de corte é reduzida de 35°C para 24°C às 4 semanas de idade e para 21-22°C às 6 semanas de idade, fato conseqüente à maturação do sistema termorregulador e ao aumento das reservas energéticas (FURLAN, 2006).

Neste sentido, o ambiente avícola deve e é considerado como uns dos principais pontos de sucesso numa granja. A manutenção da homeotermia do frango de corte está diretamente ligada a fatores ditos ambientais como às condições térmicas, destacando-se a temperatura, a umidade e a movimentação do ar (TINOCO, 1996). Entretanto, em nosso país (Brasil), existem poucas granjas com ambiente devidamente controlado e é fato que devemos levar em consideração as imensas variações climáticas percebidas, devido à grande variação da latitude do nosso país.

O conceito de bem-estar animal foi estabelecido sob aspectos muito abrangentes, e pouco científicos e, portanto de difícil aceitação por parte dos países produtores de carne e subprodutos derivados. Segundo CAST (1997) os países produtores acabam por adotar em suas rotinas, o padrão de bem-estar estabelecido pelo mercado externo. Os primeiros países a estabelecer conceitos mais pragmáticos de bem-estar e normas de criação de animais foram os países escandinavos e a França (NÄÄS et al., 2004). A conceituação de bem-estar envolve os aspectos físicos e mentais que na maior parte das vezes se direciona na preocupação de como o animal se sente, principalmente quando exposto a algum tipo de confinamento, situação

climática ou manejo. De acordo com Swanson (1995), o conceito de bem estar pode ser dividido em três aspectos: o legal, o publico e o técnico. Os conceitos legais são estabelecidos pelo sistema judicial, com padrões mínimos de normas que possam ser seguidas e aceitas pelos meios legais, e sirva de base para possíveis conflitos de interesse. O publico, envolve o conhecimento pela sociedade e as formas apaixonadas de sua expressão, principalmente por grupos organizados de defesa dos animais. Os conceitos técnicos estão baseados em informações cientificas de bem-estar animal, isto é, advindos da observação e registro sistemático de comportamentos específicos dos animais de, aspectos fisiológicos e de respostas produtivas (NÄÄS et al., 2004).

O livro branco sobre a Segurança dos alimentos, da Comissão da Comunidade Européia (2001), relata no item Saúde e Bem-Estar dos animais, que as questões do bem-estar devem ser analisadas à medida que a política de segurança de alimentos seja afetada. São consideradas bases de o bem-estar animal assegurar as seguintes liberdades: 1 - Liberdade de movimento e de expressar comportamento normal, inerente a sua espécie; 2 – Liberdade de não passar fome ou sede ou de ser mal-nutrido; 3 – Liberdade de não passar estresse físico ou térmico; 4 – Liberdade de não estar exposto a doenças e maus tratos; 5 – Liberdade de não passar medo.

A primeira norma européia aprovada que engloba os aspectos acima e regulamenta o manejo em criatórios de animais (Comission Regulation nº 436/2001) mostra que “o animal deve ter liberdade de movimentar-se com conforto e não deve estar sujeito a desconforto térmico”. Desta forma, e observando, o conforto térmico, quando a temperatura ambiente se eleva de forma critica dentro de um galpão de produção de frangos (principalmente na fase final de criação), as aves morrem, pois não conseguem manter a homeostase térmica (NAAS, 2004). Contrariamente, no entanto, ocorre nas primeiras semanas de vida das aves pois os

pintinhos sofreram muito com a queda de temperatura, que pode até mesmo aumentar a mortalidade (FURLAN, 2006).

Neste sentido, estudos têm mostrado que variações de temperatura de até 6 graus centígrados não influenciam o desempenho de frangos de corte; entretanto, diferenças superiores a 10 graus prejudicam o desempenho das aves (FURLAN, 2006). Desta forma, o estresse por calor é um dos maiores dilemas na produção de frangos, principalmente em regiões de clima quente, por causa de resultados de baixo crescimento, performance, imunossupressão e alta mortalidade (MACARI; GONZALES, 1990; SHLOSBERG et al., 1992; MUJAHID et al., 2007). Grandes perdas econômicas já foram relatadas em função da mortalidade e da queda de produção. Na vigência de altas temperaturas ambientes, a taxa de crescimento é diminuída em função da queda de apetite e do consumo alimentar, desencadeando-se aumento da freqüência respiratória, que pode levar à alcalose metabólica (HILLERMAN et al., 1985; FRANCI et al., 1994). Durante o estresse por calor (aumento súbito da temperatura ambiente), podem ocorrer desajustes fisiológicos (desequilíbrio eletrolitico), hormonais (corticosterona, T3, T4) e moleculares (MORRON-TESCH et al., 1994; GERAERT et al., 1996; LIN et al., 2006). De fato, as elevadas temperaturas ambientais podem causar efeitos adversos na estrutura e na fisiologia das células; mais especificamente, na transcrição, no processamento do RNA, e na função e estrutura das membranas celulares (IWAGAMI, 1996). Além do mais, uns dos efeitos do estresse térmico é a redução no consumo de ração e, como conseqüência, do ganho de peso, com piora da conversão alimentar (MULLER, 1982; MORROW-TESCH et al., 1994). Em conjunto, esses fatores debilitam o organismo das aves, aumentando a suscetibilidade das mesmas às doenças oportunistas. (KAMWANJA et al., 1994).

Têm-se demonstrado que a restrição alimentar e o estresse térmico por calor nas fases iniciais de vida de uma ave alteraram parâmetros imunológicos (circulação linfocitária,

atividade de macrófagos) e zootécnicos (ganho de peso, conversão alimentar) em animais de produção como, por exemplo, em criações intensivas de aves (corte e postura) e de suínos (RENAUDEAU; QUINIOU; NOBLE., 2001; LIN et al.., 2002; ALTAN et al., 2003; BARTLETT; SMITH, 2003; KHAJAVI et al., 2003LIN et al., 2004).

Neste sentido, as aves necessitam de um sistema homeostático de controle térmico eficiente. O sistema termorregulador nas aves esta baseado em quatro unidades funcionais: receptor, controlador e efetor. Os receptores, os neurônios sensoriais térmicos, irão receber os estímulos, e enviá-los para o SN, o controlador central. Os mecanismos efetores irão responder aos estímulos do Sistema Nervoso, com alterações comportamentais, fisiológicas, e hormonais que se estabelecem para controlar a temperatura corpórea. Dessa forma, os mecanismos controladores da temperatura corpórea irão atuar para manter a temperatura normal da ave (41,1°C). O controle da temperatura das aves é feito com base no balanço de duas variáveis: uma associada às respostas desencadeadoras pelo aumento da temperatura e a outra à redução da temperatura. Assim, observamos duas populações de neurônios no hipotálamo da ave. Os neurônios do calor, que são ativados quando temos aumento da temperatura corpórea, produzindo respostas de perda de calor; e os neurônios do frio, que ao serem estimulados, induzem uma resposta de conservação de calor (MARCARI; FURLAN; MAJORKA, 2004).

Dentro desse contexto, o conceito de set-point termorregulador é fundamental tanto em aves como em mamíferos, pois o sistema homeostático de controle de temperatura sempre atua com uma referência fixa e resistente a qualquer alteração. O ponto de referencia do frango é 41,1°C, e esse não é variável, sendo que todos os sistemas funcionam para manter a temperatura nesse valor. Quando as atividades dos neurônios de calor e o de frio se igualam, a produção e a perda de calor serão iguais, mantendo-se a temperatura da ave estável. Durante o desenvolvimento do frango de corte, esse sistema termorregulador vai amadurecendo.

Inicialmente, pintinhos de um dia necessitam ser mantidos em ambientes com temperatura variando entre 32°C e 33°C, pois não tem capacidade de controle da temperatura interna, uma vez que seu sistema termorregulador não esta totalmente desenvolvido. Já as aves na ultima semana de criação (35 a 42 dias), apresentam um sistema termorregulador totalmente apto para controles térmicos, resistindo mais a temperaturas frias, diferentemente de que o faz às temperaturas quentes. De fato, aves parecem sofrer mais com o estresse térmico por calor do que por frio, devido ao fato de que seu sistema termoregulador é mais adequado para reter calor do que para dissipá-lo (FURLAN, 2006) .

De acordo com Borges et al. (2004), o aumento progressivo da temperatura ambiente (32°C/30 mim, 36°C/30 mim, 37°C/15 mim e 41°C/45 mim) em frangos de corte com 42-44 dias de idade, diminuiu o numero de linfócitos circulantes e causou desbalanço eletrolítico. Outros pesquisadores observaram diminuição do número de linfócitos no sangue e no baço, em aves expostas a temperaturas de 35° C / 6 horas/dia, por 5 dias consecutivos (TROUT; MASHALY, 1994). Podemos citar que o estresse por calor (35°C constate por 5 semanas) em poedeiras, diminuiu o desempenho produtivo (peso corporal e conversão alimentar) a produção e a qualidade dos ovos. Nesta condição, os leucócitos circulantes diminuíram, assim como o titulo de anticorpos dos animais submentidos ao calor ambiental. Adicionalmente, observou-se maior mortalidade dos animais submetidos ao calor quando comparados com outros de um grupo controle e com um grupo mantidos em temperatura cíclica (23,5°C para 35°C) (MASHALY et al., 2004). O estresse por calor em aves mantidas dos 35 a 41 dias de vida, a uma temperatura de 39 ± 1°C por 7h/dia, diminuiu a porcentagem de linfócitos CD4+ e CD8+ no sangue periférico e os títulos de anticorpos para hemácias de carneiro (KHAJAVI et al., 2003).

Neste mesmo contexto, Bartlett e Smith (2003) tentando avaliar o efeito dos níveis de zinco na dieta sobre características de performance e imunocompetência de aves criadas em

ambiente termoneutro e em temperaturas elevadas, demonstraram que uma flutuação diária da temperatura ambiente (23,9°C/12h, 23,9-37°C/3h, 37°C/6h e 37-23,9°C/3h) do 21° até 34° dia de vida do frango de corte bem como dos níveis de zinco presentes na dieta influenciaram na atividade dos macrófagos. Mais especificamente, o estresse térmico diminuiu e as altas concentrações de zinco na dieta aumentaram o percentual de fagocitose de hemácias de carneiro (opsonizadas ou não) realizada por macrófagos peritoneais. Entretanto, a dieta suplementada com zinco não foi capaz de reverter o efeito observado nas aves submetidas ao estresse térmico indicando, desta forma, que outro fator além da composição da dieta estaria correlacionado com os efeito da estresse térmico sobre a atividade dos macrófagos.

De tudo quanto foi exposto pode-se pensar em uma interação neuro-imune como sendo responsável pelos efeitos relatados por Bartlett e Smith (2003) para o estresse térmico sobre a atividade de macrófagos; mais especificamente, pode-se sugerir uma ativação do eixo HHA e/ou do sistema nervoso simpático, conforme amplamente salientado acima.

Parece ser consenso geral, entre os autores, a noção de que o estresse térmico interfira com a resposta imune de frangos de corte. Entretanto, pouco se sabe sobre o efeito do estresse térmico por calor quando aplicado nas ultimas fases de vida desses animais, sobre a esfera neuroimune das aves, em especial sobre a atividade imune inata. Assim, é possível que uma provável diminuição da imunidade inata (atividade de macrófagos) induzida pelo estresse por calor entre o 35º e o 41º dias de vida em frangos de corte, poderia facilitar o aparecimento de doenças oportunistas e uma possível migração de bactérias patogênicas do trato intestinal para órgãos vitais como fígado e pulmão, com isso, aumentando a necessidade de utilização de antibióticos de forma preventiva ou terapêutica nesses animais, fato no momento questionado em função não apenas do custo destes medicamentos, mas também e principalmente, pela possibilidade que eles têm de contaminar o meio ambiente, de induzir resistência bacteriana e de deixar resíduos na carcaça dos animais tratados. Desta forma, fica claro a importância de

estudos que busquem correlacionar os efeitos induzidos pelo estresse térmico sobre os índices zootécnicos, o hemograma, os níveis de corticosterona, os órgãos linfóides, e a atividade de macrófagos peritoneais de frangos de corte. Por outro lado, é também objeto do presente trabalho a análise da integridade da mucosa do trato gastrointestinal de aves submetidas ao estresse térmico e, muito especialmente, daquela do intestino delgado. De fato, sabe-se ter o duodeno a maior altura de vilos, a maior taxa de renovação da mucosa intestinal e a maior relevância para os processos digestórios (MACARI; MALHEIROS; FURLAN, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Estudar em frangos de corte as relações existentes entre os efeitos de um estresse térmico por calor sobre índices zootécnicos, peso dos órgãos linfóides, eritrograma e leucograma, níveis séricos de corticosterona, níveis plasmáticos de adrenalina e noradrenalina, integridade do trato intestinal e atividade de macrófagos peritoneais.

3.2 Objetivos específicos

- Medir o consumo de ração, a conversão alimentar, o peso corporal e o ganho de peso de frangos submetidos a estresse térmico por calor entre os 35° a 41° dias de vida.

- Avaliar em frangos, o impacto do estresse térmico por calor entre os 35° a 41° dias de vida sobre o peso relativo dos órgãos linfóides.

- Analisar o hemograma (eritrograma e leucograma) de frangos submetidos a estresse térmico por calor entre os 35° a 41° dias de vida.

- Medir os níveis de corticosterona sérica de frangos de corte submetidos a estresse térmico por calor entre os 35° a 41° dias de vida.

- Avaliar a atividade de macrófagos peritoneais de frangos de corte, submetidos ao estresse térmico por calor entre os 35° a 41° dias de vida, através de citometria de fluxo.

- Avaliar a integridade da mucosa do intestinal de frangos de corte submetidos ao estresse térmico por calor entre os 35º a 41º dias de vida.

- Correlacionar os dados obtidos e interpretá-los dentro de uma perspectiva neuroimunológica

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados frangos de corte, da linhagem Ross, adquiridos de incubatório comercial com 1 dia de vida, sendo então mantidos nas dependências do Centro Experimental de Patologia Experimental do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As aves foram alojadas em piso, com cama de maravalha, respeitando-se um limite máximo de 10 aves/m² (Figuras 1, 2, 3, 4 e 5) As aves receberam luz artificial durante o período noturno e foram observadas constantemente, verificando-se o seu estado de saúde e comportamento, e computando-se eventuais mortes. A ração fornecida às aves foi do tipo comercial isento de antimicrobianos e outros fármacos, sendo administrada aos animais em quantidades conhecidas.

Para a manipulação dos animais foram seguidas as normas exigidas pelo Comitê de Ética para o uso de animais de experimentação, vigente na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. (Protocolo nº 1053/2007).

Figura 1 - Visão frontal das salas climatizadas. As setas indicam as duas salas usadas

Figura 2 - Computador e termômetro digital. A seta indica o termômetro digital

Figura 3 - Estrutura interna de uma das salas climatizadas

Figura 4 - Estrutura interna de uma das salas climatizada

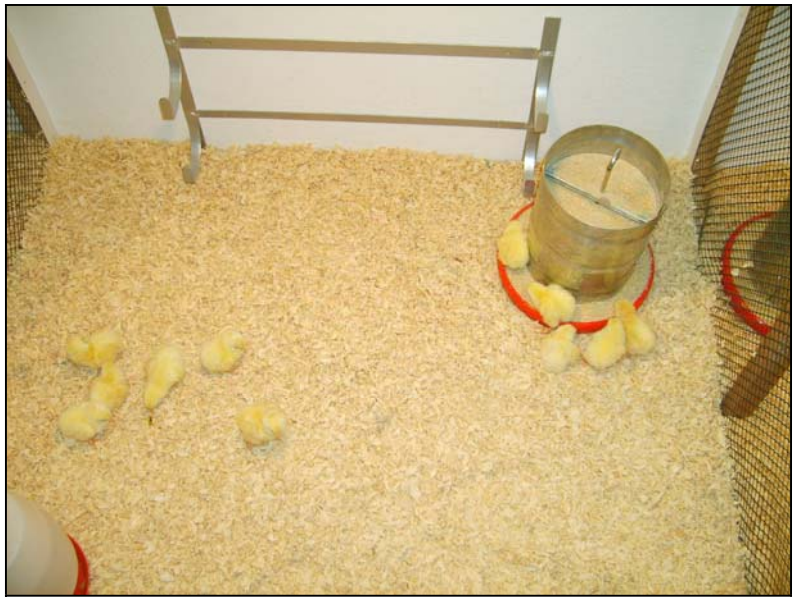


Figura 5 - Box com aves de 1 dia em uma das salas

4.2 Corantes Celulares

- Azul de TRIPAN (*Merck*®) a 0,1% - Utilizado para corar as células do lavado peritoneal.
- ROSENFELD (*Merck*®) - Utilizado para corar as células coletadas do sangue periférico para contagem diferencial de leucócitos.
- Natt e Herrick – Utilizada para corar as células coletadas do sangue periférico para contagem de hemácias e leucócitos totais.

4.3 Reagentes e soluções

- Diacetato 2`7`Diclorofluoresceína (DCFH-DA/ Molecular Probes, Eugene, OR) - empregado na citometria de fluxo. Este reagente foi mantido congelado (-20ºC) e protegido da luz, sendo dissolvido em PBS no momento de uso.
- EDTA (Sigma®) - utilizado na técnica de fagocitose, na concentração de 3mM, com o objetivo de interromper a reação após o período de incubação das amostras.
- Iodeto de Propídio (PI) (Sigma®) - utilizado na técnica de citometria de fluxo, responsável pela emissão de fluorescência vermelha captada pelo citômetro.
- NaCl 0,85% e NaCl 0,9% - Soluções utilizadas na técnica de conjugação do *Staphylococcus aureus* - Cepa ATCC 25923 (DIFCO®) – bactéria marcada com Iodeto de Propídio (Sigma, St Louis, MO) utilizada para avaliar a atividade fagocítica de macrófagos peritoneais. A solução de NaCl 0,9%, também foi utilizada para limpeza das amostras do trato gastrointestinal.

- PBS (Phosfate-buffered saline, pH=7,2-7,4) - Solução utilizada nas técnicas de *burst* oxidativo e fagocitose.
- PBS glicosado - Solução utilizada na técnica de conjugação do *Staphylococcus aureus*.
- EDTA 10% - anticoagulante utilizado nas coletas de amostras de sangue.
- Sephadex G50 superfine (Pharmacia) – substancia utilizada para estimular a migração de macrófagos para o peritôneo de aves.

4.4 Procedimentos

4.4.1 Estresse térmico

Após 5 semanas de criação à temperatura recomendada (33 ± 1°C do 1° até o 7, 28°C ± 1°C do 7 até o 21° de vida; 24 ± 1°C do 22° dia até o 35° dia de vida), as aves foram pesadas. Elas foram então randomicamente divididas em dois grupos (um grupo controle e um experimental) sendo colocadas em ambientes distintos; a temperatura desses ambientes foi controlada através de um condicionador de ar (um para cada ambiente) durante a 6ª semana de vida dos animais (35° dia de vida até o 42° dia de vida dos animais). Nestes ambientes, os animais do grupo controle permaneceram em temperatura termoneutra durante esse período (21± 1°C do 35 º ao 42º dia de vida). Os frangos dos grupos experimentais ficaram em ambiente em que se produziu calor, isto é, onde a temperatura girou em torno de 26±1° (Experimental 1), 31±1°C (Experimental 2) e 26°±1°C (Experimental 3), respectivamente, durante 10h/dia, mimetizando o período mais quente do dia. Durante o período restante, a temperatura foi reduzida para 26° C, mimetizando o período noturno, momento que se

observa uma queda natural de temperatura. Permitiu-se que a umidade relativa flutuasse; entretanto esta era controlada de forma tal, que não caísse abaixo de 45%.

4.4.2 Avaliação do desempenho produtivo das aves

O desempenho das aves foi determinado calculando-se o desenvolvimento ponderal, o consumo de alimento, a conversão alimentar e a mortalidade. A conversão alimentar foi avaliada pelo consumo de ração em relação ao ganho de peso. Os dados foram coletados durante o período experimental (35º ao 42º dias), sendo que em cada lote experimental utilizamos 120 aves. Foi realizado 5 replicações por grupo (5 boxes com 12 animais cada), onde cada replicação representa uma unidade amostral (N). As aves foram observadas diariamente, avaliando-se seu estado de saúde e comportamento, e anotando-se as eventuais mortes.

4.4.3 Seleção amostral

Em cada lote experimental utilizamos 120 frangos que foram divididos em dois grupos: controle e experimental, cada um mantido em sua respectiva sala. Cada sala foi dividida em 5 boxes de 1,2 m^2, com 12 animais cada (Figuras 1 e 2). A seleção amostral foi realizada pela escolha de 20 animais (10 controles e 10 experimentais), que foram selecionados randomicamente, respeitando-se o critério de 2 animais por box.

4.4.4 Determinação de hemograma

O hemograma foi constituído pelo eritrograma e pelo leucograma. Foram colhidos pela veia braquial, 2,0 ml de sangue com seringas sem anticoagulante, os quais foram transferidos para um frasco com 0,02 ml de solução aquosa de etilenodiamino-tetracética-disódica (EDTA) a 10%, promovendo-se adequada homogenização. Após a coleta, as amostras de sangue foram imediatamente submetidas aos exames. Com o sangue *in natura*, foram realizados esfregaços sanguíneos que após secarem, foram corados pelo corante de Rosenfeld. Logo em seguida, as amostras de sangue foram diluída em solução de Natt e Herrick, para contagem de hemácias e leucócitos totais. As análise forma realizadas conforme descrito por Campbell (1988).

4.4.5 Quantificação dos Níveis Séricos de Corticosterona

Coleta de sangue para obtenção do soro

A coleta do sangue foi realizada pela veia braquial, na parte interior da asa. Este método de exsanguinamento foi realizado em menos de 30 segundos por ave, sendo que o sangue coletado era armazenado em tubos do tipo *eppendorfs* de polietileno. O sangue permaneceu à temperatura ambiente até a retração do coágulo sendo, então, centrifugado sob refrigeração (3220g/15 minutos e temperatura ao redor de 4 °C) para obtenção do soro, o qual foi armazenado em *frezzer*, a -80°C por no máximo 30 dias até o momento da realização das

dosagens hormonais. Os animais dos grupos experimentais e controles foram exsanguinados intercaladamente entre 9:00 e 11:00 horas da manhã.

A dosagem de corticosterona foi realizada por radioimunoensaio através de kits comerciais (MP Biomedicals, LLC Orangeburg, NY), conforme descrito por Kannan et al. (1998).

4.4.6 Coleta de material para exames histopatológicos

Ao final do período de avaliação, os animais foram submetidos à eutanásia através do deslocamento da articulação atlanto-occipital, sendo imediatamente necropsiados para observação macroscópica de possíveis lesões induzidas pelo estresse por calor. Dos animais necropsiados era, então, realizada a colheita de fragmentos representativos do intestino delgado como mostra o item 4.4.7. Estes fragmentos foram fixados em formol a 10%. Foram, também, colhidos os órgãos linfóides (baço, timo e bursa de Fabricius) inteiros, para realização de pesagem e posterior analise do peso relativo de cada órgão.

4.4.7 Análise da integridade do trato intestinal

Necropsia e coleta do trato intestinal

As aves dos grupos controle e experimental foram necropsiadas no final dos experimentos. Foi empregada a técnica padrão de exame macroscópico de aves. Fragmentos dos segmentos do duodeno, jejuno (aproximadamente 5 cm posterior a abertura dos ductos pancreático e biliar) e íleo (aproximadamente 5 cm anterior a junção ileo-cecal), foram

colhidos para exame histopatológico, no decorrer da necroscópica, tendo sido fixados em formol a 10%.

Exame anatomopatológico qualitativo e semiquantitativo

As amostras coletadas e fixadas foram processadas segundo a técnica padrão para exame microscópico de órgãos no Laboratório de Histologia do VPT-FMVZ (HODGES, 1974; RIDDELL, 1987). Os cortes longitudinais e transversais dos segmentos de intestino foram corados em hematoxilina e eosina (HE). O exame histológico das lâminas foi realizado em microscopia de luz, com aumentos de 40, 100 e 400x.

Os segmentos intestinais foram avaliados quanto à estrutura geral (mucosa, submucosa e camadas musculares) e quanto aos seguintes critérios: relação vilo/cripta, tamanho da vilosidade, morfologia da cripta, intensidade do infiltrado inflamatório na lâmina própria, tipo do infiltrado inflamatório (mononucleares e granulócitos) e densidade de linfócitos intra-epiteliais. A presença ou não de ulceração ou de agentes infecto-parasitários foi também avaliada de forma qualitativa.

O padrão histológico intestinal de normalidade foi definido segundo Hodges (1974) e Riddell (1987).

A intensidade das alterações observadas no intestino delgado foi avaliada semiquantitativamente na escala de 0 a 3, onde: 0 = parâmetro tido como dentro da normalidade, 1 = alterações mínimas, 2 = alterações em grau moderado e 3 = grau máximo de alteração.

Critérios de exclusão:

1- observação de agentes parasitários no exame microscópico.

2- indicações de ocorrência de autólise do material.

4.4.8 Análise de macrófagos peritoneais

Estimulação de células peritoneais pelo Sephadex

Devido ao fato de as aves não possuírem macrófagos residentes e outras células inflamatórias na cavidade abdominal (SABET et al., 1977; TREMBICKI et al., 1984), nós utilizamos o método de estimulação destas células com Sephadex G-50, conforme previamente descrito por Qureshi, Dietert e Bacon (1986), já utilizado em nossos laboratórios (MORGULIS; RODRIGUES; PALERMO-NETO, 1999). Foi utilizada a dose de 1,0 ml de solução de Sephadex a 3,0%, em solução salina a 0,9%, para cada 200g de peso corpóreo. No segundo dia após a inoculação, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. Foi inoculado na cavidade peritoneal 20 ml de RPMI-1640 sendo feita a massagem das alças intestinais; em seguida foi realizada a colheita do lavado peritoneal. O lavado resultante foi aspirado e colocados em tubos de propileno, previamente identificados; os quais foram mantidos em banho de gelo durante todo o procedimento experimental. Após a colheita foi feito a quantificação total em câmara de Neubauer, seguida do teste de viabilidade celular através do teste de exclusão por azul de tripan, sendo o número de células ajustado para 1 x 10^6 por ml de solução.

Fenotipagem de macrófagos perironeais

Foi realizado a fenotipagem de macrófagos do lavado peritoneal, utilizando-se o marcador KUL 01 (ABcam, Cambridge, MA) especifico para macrófagos de *Gallus gallus domesticus*, conforme descrito por Mast et al. (1998). Foi realizada uma seqüência de tubos, um para cada amostra coletada, e então, adicionado 1µl de KUL 01 em cada amostra, que foi

incubado por 30 minutos, em temperatura ambiente. Logo após esse período, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1932g. Em seguida, procedeu-se à leitura das amostras no citômetro de fluxo.

4.4.9 Avaliação da fagocitose e do *burst* oxidativo de Macrófagos por Citometria de Fluxo

O preparo das amostras foi realizado de acordo com Hasui et al. (1989), da seguinte maneira:

Após o sacrifício dos animais, uma bateria de 5 tubos foi montada e numerada de "A" até "D" para cada animal. Cada tubo (de acordo com a letra) recebeu uma substância diferente, obedecendo-se sempre a uma mesma ordem.

Desta forma, todos os tubos de "A" a "D" receberão alíquotas de líquido peritoneal colhidos dos animais ($1x10^6$ células), correspondendo os macrófagos. Os tubos com as letras "B" e "D" receberam 200µl da solução de DCFH-DA 3 mM cada. Todos os tubos de letra "C" e "D" receberam 50µl da solução de SAPI (50ng). Como as amostras deverão ter o volume final de 1100 µl, todos os tubos foram completados com PBS 1x, conforme o volume de líquido peritoneal utilizado.

Em seguida, os tubos foram incubados em estufa sob agitação a 37ºC por 30 minutos. Depois da incubação, foram adicionados 2 ml de EDTA 3 mM em todos os tubos que receberam SAPI para interromper a reação, sendo os mesmos posteriormente centrifugados por 10 minutos a 1932g.

Nesta etapa foi utilizado líquido peritoneal (para análise da atividade dos macrófagos) desprezando-se o sobrenadante após a centrifugação; as células foram, então, ressuspensas por agitação manual sendo adicionadas de 200µl de PBS. Após todo este procedimento, foi realizada a leitura das amostras no citômetro de fluxo; os tubos "A"e "C" foram utilizados

para a avaliação da Fagocitose, enquanto que os tubos “B” e “D” foram utilizados para avaliação do *Burs*t Oxidativo.

Cada amostra passou pelo citômetro apenas 1 vez, e de cada uma, foram adquiridos 10.000 eventos (células). A fluorescência foi obtida padronizando-se o número de eventos para cada tubo A, B, C e D. Os valores referentes ao *Burst* oxidativo das amostras foram avaliados por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pela população de macrófagos de acordo com o respectivo experimento. Este valor de média geométrica foi fornecido pelo aparelho sendo utilizado para indicar a intensidade de fluorescência das células.

Com relação à atividade fagocítica, analisamos a porcentagem de fagocitose, ou seja, o número de macrófagos que fagocitam o *S. aureus* marcado com PI e, conseqüentemente que emitiram fluorescência verde, divididos pelo número total destas células multiplicadas por 100. Foi avaliada, também, a intensidade de fagocitose (quantidade de bactérias fagocitadas) por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência vermelha emitida pelos macrófagos de acordo com o respectivo experimento.

4.4.10 Análise estatística

Antes de aplicar-se à análise estatística destinada a possibilitar a interpretação dos resultados obtidos, verificamos, através do teste de Bartlet, qual tipo de teste - paramétrico ou não paramétrico - seria o mais adequado para cada situação experimental.

Em sendo os dados paramétricos, foram empregados o teste “t” de Student (para análise de dois grupos) ou a análise de variância ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey – Kramer de comparações múltiplas (para análise de mais de dois grupos simultaneamente). Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste “U” de Mann-Whitney (para análise de dois grupos) ou pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, para detecção de possíveis diferenças entre os diferentes grupos de animais. Em todos os testes aplicados, a probabilidade de $p<0,05$ indicou diferenças significantes.

Todas as análises estatísticas foram feitas com o auxílio dos programas estatísticos denominados GRAPHPAD INSTAT em sua versão 3.01 e GRAPHPAD PRISMA em sua versão 5.0.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

Foram realizados 6 experimentos independentes. Os grupos experimentais C1 e E1, C2 e E2 e C3 e E3 usados nos experimentos 1 e 4, 2 e 5 e 3 e 6 dizem respeito a estudos conduzidos a 36±1ºC, 31±1ºC e 26±1ºC, respectivamente. Em todos os experimentos foram seguidos os critérios e normas de Boas Práticas Laboratoriais e de Campo.

5.1 EXPERIMENTO 1 – Avaliação dos índices zootécnicos, do peso relativo dos órgãos linfóides e da integridade do trato gastrointestinal em frangos de corte, submetidos ou não a estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

Foram utilizados 120 frangos de corte divididos ao acaso em 2 grupos iguais C_1 e E_1, conforme descrito em 4.4.1. Os animais do grupo controle (C_1) permaneceram em temperatura termoneutra, e os do grupo experimental (E_1) em temperatura a 36±1ºC, produzindo desta forma o estresse térmico, conforme descrito no item 4.4.1. Durante todo o período experimental foram analisados os índices zootécnicos conforme descrito no item 4.4.2. No 42º dia de vida, selecionamos uma amostra de aves dos grupos C_1 e E_1, conforme item 4.4.3 e realizamos a eutanásia e a necropsia dos mesmos conforme descrito em 4.4.6. Os órgãos linfóides foram coletados e pesados conforme item 4.4.6; e o trato intestinal foi, também, retirado para análise de sua integridade como descrito em 4.4.7. A figura 6 ilustra este protocolo experimental.

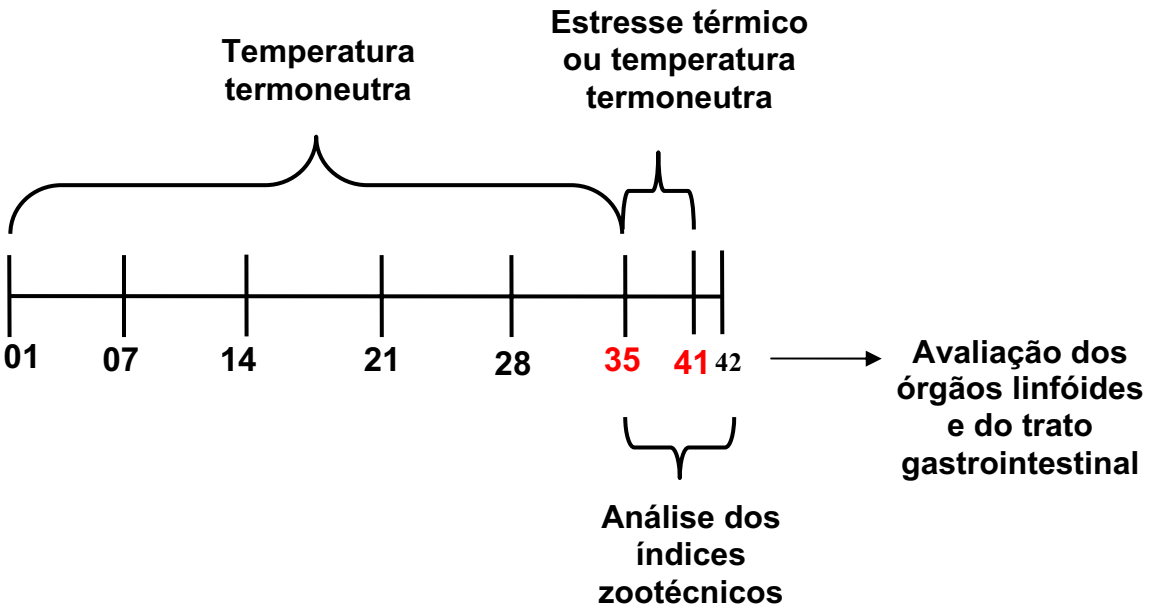


Figura 6 – Esquema do protocolo experimental que foi utilizado nos experimentos 1, 2 e 3

Resultados

O estresse térmico por calor (36±1ºC) por uma semana (35º ao 41º dia de vida dos frangos) foi capaz de interferir com os índices zootécnicos dos mesmos. De fato, observarmos que esse estresse diminuiu estatisticamente o ganho de peso ($U=25,00$; $p<0,001$), o consumo de ração ($U=25,00$; $p<0,001$), a conversão alimentar das aves ($U=23,00$; $p<0,05$) e induziu a morte de 43,33% dos animais do grupo 36±1ºC ($X^2=33,05$; $p<0,001$), quando comparados com os animais do grupo controle. A tabela 1 mostra os resultados obtidos nesse procedimento, e as figuras 7, 8, 9 e 10 os ilustram.

Tabela 1 – Avaliação dos índices zootécnicos em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

ÍNDICES ZOOTÉCNICOS	C_1	E_1 (36±1ºC)
Ganho de peso (g)	622,70 ± 39,22	347,72 ± 109,70 ***
Consumo de ração (g)	1521,36 ± 5,97	1137,32 ± 117,62**
Conversão alimentar	2,45 ± 0,15	3,40 ± 1,14*

Os dados representam a média ± desvio padrão de N=5 lotes/grupo, sendo cada lote=12animais. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao controle.Teste de Mann-Whitney.

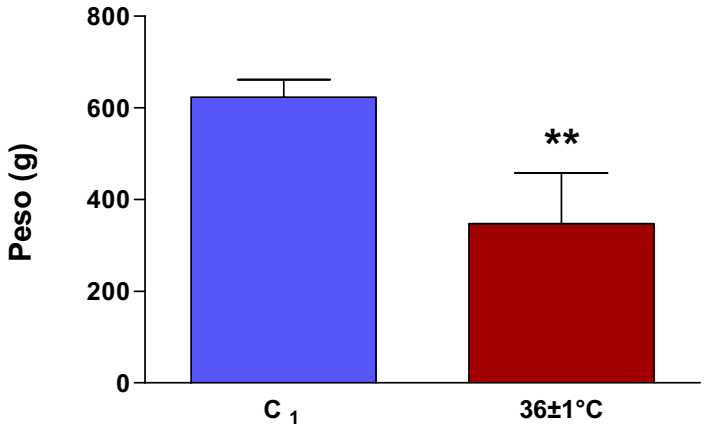


Figura 7 – Avaliação do ganho de peso (g) em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida. Os dados representam a média ± desvio padrão de N=5 lotes/grupo, sendo cada lote=12 animais. ***p<0,001 em relação ao grupo controle. Teste de Mann-Whitney

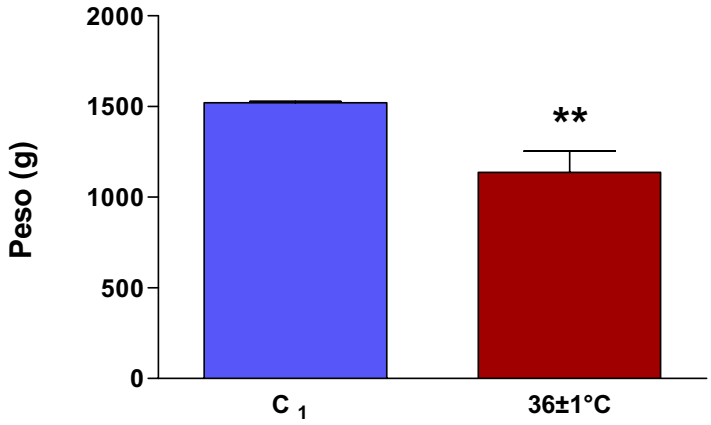


Figura 8 – Avaliação do consumo de ração (g) em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida. Os dados representam a média ± desvio padrão de N=5 lotes/grupo, sendo cada lote=12animais; **p<0,01 em relação ao grupo controle. Teste de Mann-Whitney

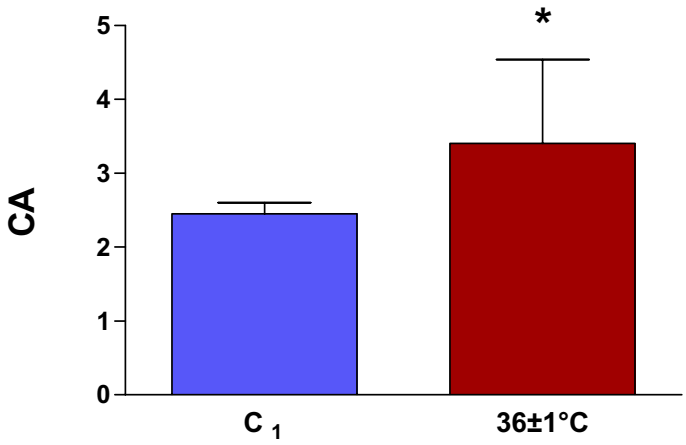


Figura 9 – Avaliação da conversão alimentar em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida. Os dados representam a média ± desvio padrão de N=5 lotes/grupo, sendo cada lote=12animais; *p<0,05 em relação ao grupo controle. Teste de Mann-Whitney

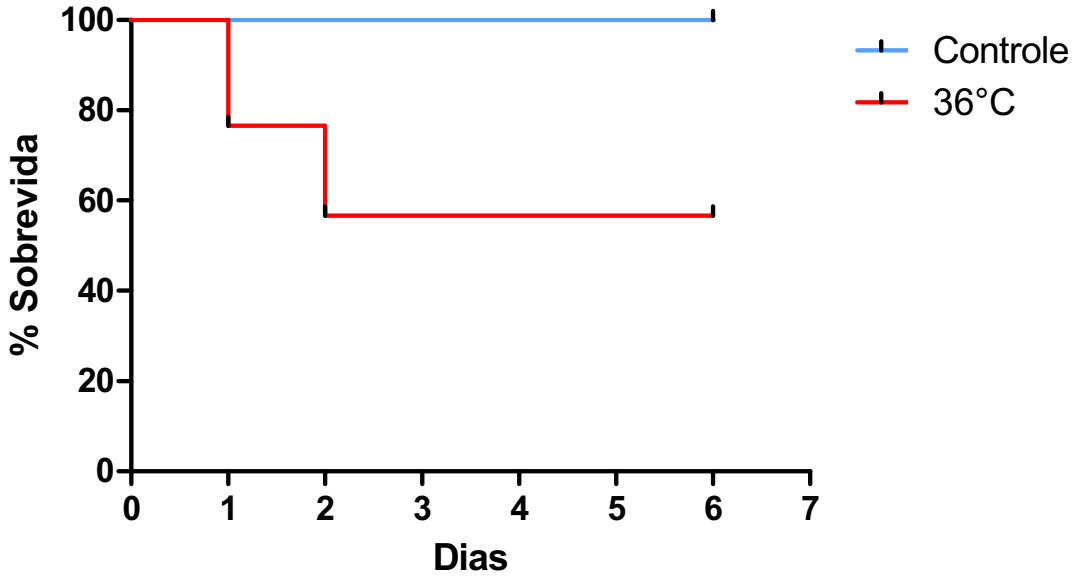


Figura 10 – Efeitos do estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia sobre a porcentagem de sobrevida de frangos de corte. N=5 lotes/grupo, sendo cada lote=12animais. p<0,001 em relação ao grupo controle. Teste Log-rank (Mantel-Cox)

O estresse térmico por calor (36±1ºC) por uma semana (35º ao 41º dia de vida dos frangos) não alterou estatisticamente o peso relativo do baço dos animais, em relação àquele observado no grupo controle. Porém, observamos que esse estresse diminuiu estatisticamente o peso relativo do timo (t=4,796; p<0,001) e da bursa de Fabricius (t=5,490; p<0,001), quando comparados animais do grupo controle. A tabela 2 mostra os resultados obtidos nesse procedimento, e as figuras 11 e 12 os ilustram.

Tabela 2 – Avaliação dos órgãos linfóides de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

PESO RELATIVO %	C_1	E_1 (36±1ºC)
TIMO	0,58±0,08	0,42±0,06***
BAÇO	0,09±0,02	0,07±0,02
BURSA	0,21±0,04	0,12±0,04***

Os dados representam a média ± desvio padrão de N=10 animais/grupo. ***p<0,001 em relação ao grupo controle. Teste "t" de Student.

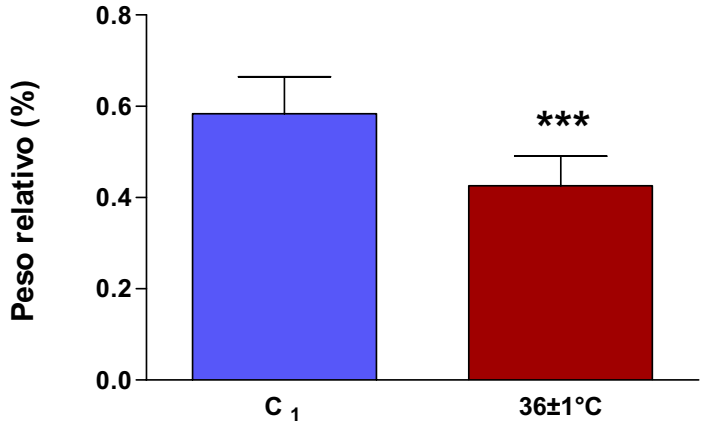


Figura 11 – Efeitos do estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia sobre o peso relativo (%) do timo de frangos de corte machos. Os dados representam a média ± desvio padrão. N=10 animais/grupo. ***p<0,001 em relação ao grupo controle. Teste "t" de Student

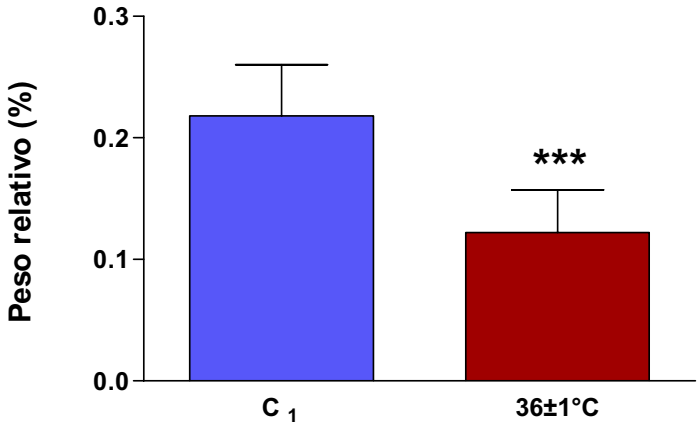


Figura 12 – Efeitos do estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia sobre o peso relativo (%) da bursa de Fabrícius de frangos de corte machos. Os dados representam a média ± desvio padrão. N=10 animais/grupo. ***p<0,001 em relação ao grupo controle. Teste "t" de Student

Os dados referentes ao exame microscópico do intestino delgado estão descritos no próximo item: 8.1 – Comparação entre os resultados obtidos nas temperaturas 26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC.

5.2 EXPERIMENTO 2 – Avaliação dos índices zootécnicos, do peso relativo dos órgãos linfóides e da integridade do trato gastrointestinal em frangos de corte, submetidos ou não a estresse térmico por calor (31±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

Foram utilizados 120 frangos divididos ao acaso em 2 grupos iguais C_2 e E_2, conforme descrito em 4.4.1. Os animais do grupo controle (C_2) permaneceram em temperatura termoneutra e os do grupo experimental (E_2) em temperatura a 31±1ºC, produzindo-se desta forma o estresse térmico, conforme descrito no item 4.4.1. Durante todo o período experimental foram analisados os índices zootécnicos conforme descrito no item 4.4.2. No 42º

dia de vida dos animais, selecionamos uma amostra de aves conforme o item 4.4.3 e realizamos a eutanásia e necropsia das mesmas conforme descrito em 4.4.6. Os órgãos linfóides foram coletados e pesados conforme item 4.4.6; o trato intestinal foi, também, retirado para análise de sua integridade como descrito em 4.4.7. A figura 6 ilustra este protocolo experimental.

Resultados

O estresse térmico por calor (31±1ºC) por 6 dias (35º ao 41º dia de vida das aves) foi capaz de interferir com os índices zootécnicos dos animais. De fato, podemos observar que esse estresse diminuiu estatisticamente o ganho de peso ($t=4,393$; $p<0,01$), o consumo de ração ($t=4,817$; $P<0,01$) das aves do grupo experimental em relação àquelas do grupo controle. Não observamos diferenças estatísticas com relação à conversão alimentar e à mortalidade. A tabela 3 mostra os resultados obtidos nesse procedimento, e as figuras 13 e 14 os ilustram.

Tabela 3 – Avaliação dos índices zootécnicos em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (31±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

ÍNDICES ZOOTÉCNICOS	C_2	E_2 (31±1ºC)
Ganho de peso (g)	580,015 ± 53,79	442,46 ± 44,80 **
Consumo de ração (g)	1357,15 ± 56,01	1138,83 ± 84,47**
Conversão alimentar	2,35 ± 0.28	2.58 ± 0.12

Os dados representam a média ± desvio padrão de N=5 lotes/grupo, sendo cada lote=12 animais. **p<0,01 em relação ao controle e ***p<0,001 em relação ao controle. Teste "t" de Student.

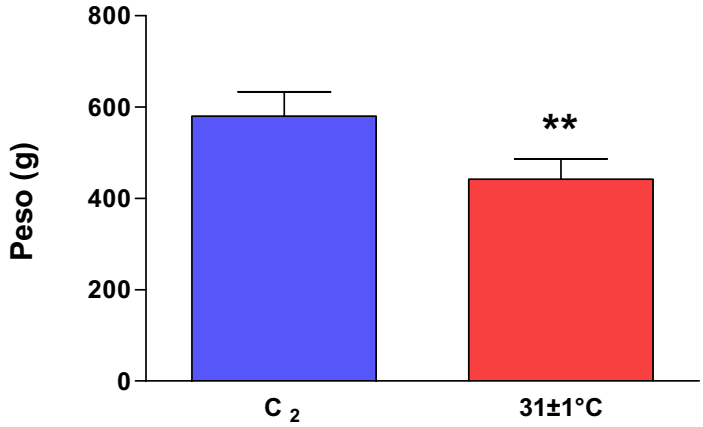


Figura 13 – Avaliação do ganho de peso (g) em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (31±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida. Os dados representam a média ± desvio padrão de N=5 lotes/grupo, sendo cada lote=12 animais. **p<0,01 em relação ao grupo controle. Teste "t" de Student

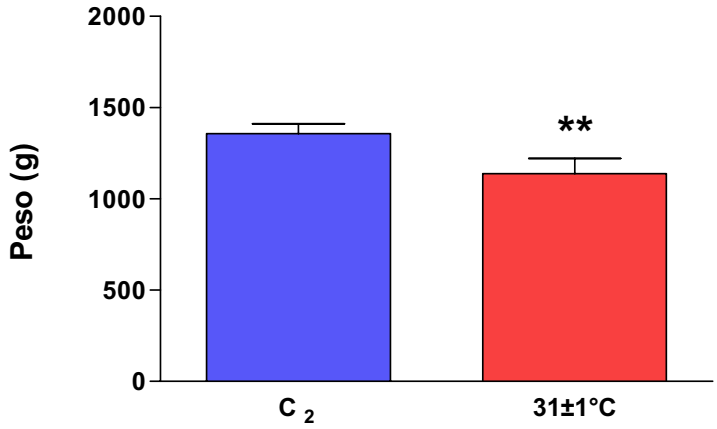


Figura 14 – Avaliação do consumo de ração (g) em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (31±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida. Os dados representam a média ± desvio padrão de N=5 lotes/grupo, sendo cada lote=12 animais. **p<0,01 em relação ao grupo controle. Teste "t" de Student

Ainda, foi possível constatar que a aplicação de um estresse térmico por calor (31±1ºC) por uma semana (35º ao 41º dia de vida das aves) não alterou estatisticamente (p>0,05) o peso relativo do timo e do baço de frangos de corte, quando comparados com aquelas coletadas dos animais do grupo controle. Porém, observamos que esse estresse diminuiu estatisticamente o peso relativo da bursa de Fabrícius (t=5,398; p<0,001). A tabela 4 mostra os resultados obtidos nesse procedimento, e a figura 15 o ilustra.

Tabela 4 - Avaliação dos órgãos linfóides de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (31±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

PESO RELATIVO %	C_2	E_2 (31±1ºC)
TIMO	0,55±0,11	0,52±0,07
BAÇO	0,10±0,02	0,08±0,02
BURSA	0,26±0,04	0,15±0,05***

Os dados representam a média ± desvio padrão de N=10 animais/grupo. ***p<0,001 em relação ao grupo controle. Teste "t" de Student.

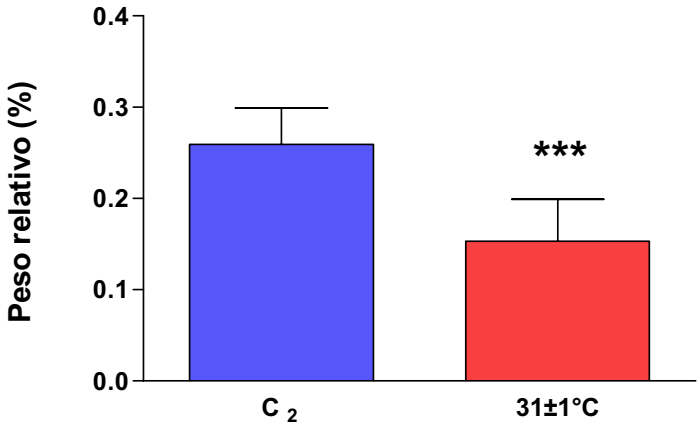


Figura 15 – Efeitos do estresse térmico por calor (31±1ºC) do 35º ao 41º dia sobre o peso relativo (%) da bursa de Fabrícius de frangos de corte machos. Os dados representam a média ± desvio padrão. N=10 animais/grupo. ***p<0,001 em relação ao grupo controle. Teste "t" de Student

Os dados referentes ao exame microscópico do intestino delgado estão descritos no próximo item 8.1 – Comparação entre os resultados obtidos nas temperaturas 26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC.

5. 3 EXPERIMENTO 3 – Avaliação dos índices zootécnicos, do peso relativo dos órgãos linfóides e da integridade do trato gastrointestinal em frangos de corte, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

Foram utilizados 120 frangos divididos ao acaso em 2 grupos iguais C_3 e E_3, conforme descrito em 4.4.1. Os animais do grupo controle (C_3) permaneceram em temperatura termoneutra e os do grupo experimental (E_3) em temperatura a 26±1ºC, produzindo-se desta forma o estresse térmico, conforme descrito no item 4.4.1. Durante todo o período experimental foram analisados os índices zootécnicos conforme descrito no item 4.4.2. No 42º dia de vida dos animais, selecionamos uma amostra de aves conforme o item 4.4.3 e realizamos a eutanásia e necropsia dos mesmos conforme descrito em 4.4.6. Os órgãos linfóides foram coletados e pesados conforme item 4.4.6; e o trato intestinal foi, também, retirado para análise de sua integridade como descrito em 4.4.7. A figura 6 ilustra este protocolo experimental.

Resultados

O estresse térmico por calor (26 ±1ºC) por uma semana (35º ao 41º dia de vida das aves) interferiu com os índices zootécnicos e com o peso dos órgãos linfóides, dos animais. As tabelas 5 e 6 mostram os resultados obtidos nesse experimento.

Tabela 5 – Avaliação dos índices zootécnicos em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

ÍNDICES ZOOTÉCNICOS	C_3	E_3 (26±1ºC)
Ganho de peso (g)	570,64 ± 95,60	569,37± 54,55
Consumo de ração (g)	1435,50 ± 82,19	1364.00 ± 46.86
Conversão alimentar	2,57 ± 0,48	2,40 ± 0,16

Os dados representam a média ± desvio padrão de N=5 lotes/grupo, sendo cada lote=12animais. p>0,05, em relação ao controle. Teste "t" de Student.

Tabela 6 – Avaliação dos órgãos linfóides de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

PESO RELATIVO %	C_3	E_3 (26±1ºC)
TIMO	0,623 ± 0,094	0,578 ± 0,066
BAÇO	0,091 ± 0,021	0,078 ± 0,014
BURSA	0,205 ± 0.064	0.195 ± 0.064

Os dados representam a média ± desvio padrão de N=10 animais/grupo. p>0,05 em relação ao grupo controle. Teste "t" de student.

Os dados referentes ao exame microscópico do intestino delgado estão descritos no próximo item 8.1 – Comparação entre os resultados obtidos nas temperaturas 26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC.

5.4 EXPERIMENTO 4 – Avaliação do hemograma, dos níveis séricos de corticosterona e da atividade de macrófagos peritoneais em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35° ao 41° dia de vida

Foram utilizados 120 frangos divididos ao acaso em 2 grupos iguais C_1 e E_1, conforme descrito no item 4.4.1. Os animais do grupo controle (C_1) permaneceram em temperatura termoneutra e os do grupo experimental (E_1) em temperatura a 36±1ºC, produzindo-se desta forma o estresse térmico, conforme descrito no item 4.4.1. Para analise de macrófagos peritoneais, no 40º dia de vida dos animais, selecionamos uma amostra de aves (item 4.4.3.) para injeção de Sephadex G50, conforme descrito em 4.4.8; no 42º dia de vida, os animais foram eutanaziados para a colheita do lavado peritoneal como descrito no item 4.4.8 e posteriormente foi realizada a analise como descrito no item 4.4.9. Para analise dos níveis de corticosterona, os frangos foram separados randomicamente como no item 4.4.3 e posteriormente foi realizada a coleta de sangue como descrito em 4.4.5. A figura 16 este protocolo experimental.

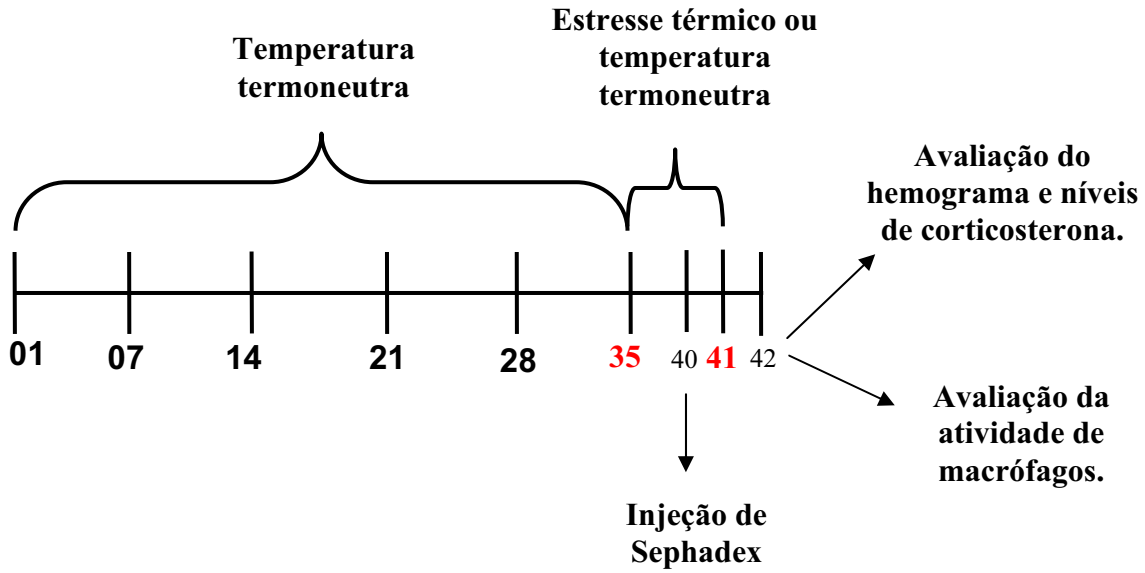


Figura 16 – Esquema do protocolo experimental que foi utilizado nos experimentos 4, 5 e 6

Resultados

O estresse térmico por calor (36 ±1ºC) por uma semana (35º ao 41º dia de vida dos frangos) não foi capaz de interferir com a quantidade de hemácias, com o hematócrito e com o numero de leucócitos; os resultados obtidos encontravam-se todos dentro dos valores hematológicos considerados como sendo normais para frangos de corte (Tabela 7). A tabela 8 mostra os resultados obtidos nesse procedimento.

Tabela 7 – Intervalo de parâmetros hematológicos considerados normais de frangos (*Gallus gallus domesticus*)

Parâmetros	Intervalo
Hemácias (10^6µl)	2,5 – 3,5
Hematócrito (%)	22 – 35
Leucócitos (10^3µl)	12 – 30
Heterófilos (10^3µl)	3 – 6
Linfócitos (10^3µl)	7 – 17,5
Monócitos (10^3µl)	0,15 – 2
Eosinofilo (10^3µl)	0 – 1
Basofilos (10^3µl)	Raros

Adaptado de Jain (1993); Cardoso e Tessari (2003)

Tabela 8 – Avaliação do hemograma em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

PARÂMETROS	C 1	E 1 (36±1ºC)
Eritrócitos (10^6µl)	2,49±0,45	2,80±0,33
Hematócrito (%)	27,30±2,54	28,20±1,61
Leucócitos (10^3µl)	10,80±2,58	10,85±2,92
Heterófilos (10^3µl)	3,49±1,38	3,34±10,33
Linfócitos (10^3µl)	6,82±1,60	6,87±2,14
Monócitos (10^3µl)	0,25±0,15	0,35±0,19
Eosinófilos (10^3µl)	0,45±0,32	0,50±0,22
Heterófilo/Linfócitos	0,49±0,16	0,50±0,14

Os dados representam a média ± desvio padrão de N=10 animais/grupo. Teste “t” de Student.

Em relação os níveis séricos de corticosterona, observamos aumento estatisticamente significante (U= 99,00, p<0,01) dos mesmos entre os frangos submetidos à temperatura de 36±1°C, quando comparado com o grupo controle. A tabela 9 mostra e a figura 17 ilustra os resultados desse procedimento.

Tabela 9 – Avaliação dos níveis séricos de corticosterona de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

Parâmetro	**C_1**	**E_1 (36±1°C)**
Corticosterona (ng/ml)	53,59±18,80	109,59±42,78**

**p<0,01. Teste de Mann-Whitney. n=10 animais/grupo

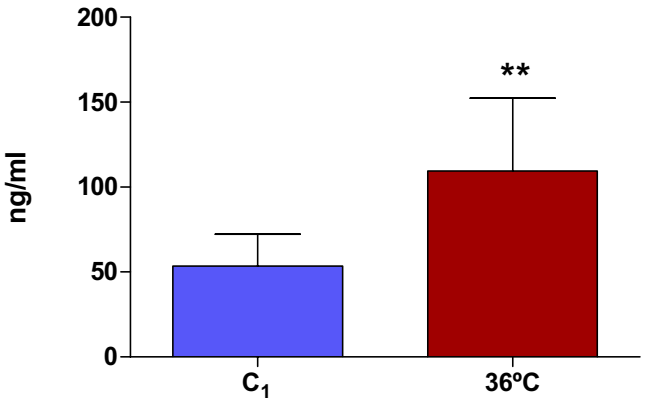


Figura 17 – Avaliação dos níveis séricos de corticosterona em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida. **p<0,01 em relação ao grupo controle, teste de Mann-Whitney. n=10 animais/grupo

Neste experimento, também analisamos a atividade de macrófagos peritoneais de frangos de corte. A fenotipagem dessas células foi realizada através do marcador KUL-01, tendo-se identificado a população de macrófagos peritoneais; sendo que obtivemos uma média maior que 90% de marcação na área selecionada para análise (Apêndice D). Esses valores foram repetidos em todos os experimentos em que se usaram os macrófagos peritoneais.

O citograma que ilustram os dados relativos ao SSC (feixe óptico de luz que indica a granulosidade da célula) *vs* FSC (feixe óptico de luz que indica o tamanho da célula) de leucócitos do lavado peritoneal dos frangos de corte são apresentados a seguir (Figura 18) bem como o histograma que ilustra a fluorescência desta célula frente ao estimulo do marcador KUL-01 (Figura 19). Citogramas e histogramas semelhantes foram utilizados para a análise individual das populações de macrófagos peritoneais das aves controles e experimentais.

Com relação à atividade de macrófagos, mensuramos o *Burst* Oxidativo basal dessas células, o *Burst* Oxidativo induzido pela Fagocitose e a Fagocitose (intensidade e porcentagem). Não encontramos diferenças estatísticas ($p>0,05$) entre os grupos controle e experimental nos valores referentes ao *Burst* Oxidativo Basal e Fagocitose (intensidade e porcentagem); porém, observamos diferenças no *Burst* Oxidativo induzido pela fagocitose ($t=2,740$; $p<0,05$). As tabelas 10 e 11 mostram os valores e a figura 20 ilustra os resultados obtidos nesse experimento.

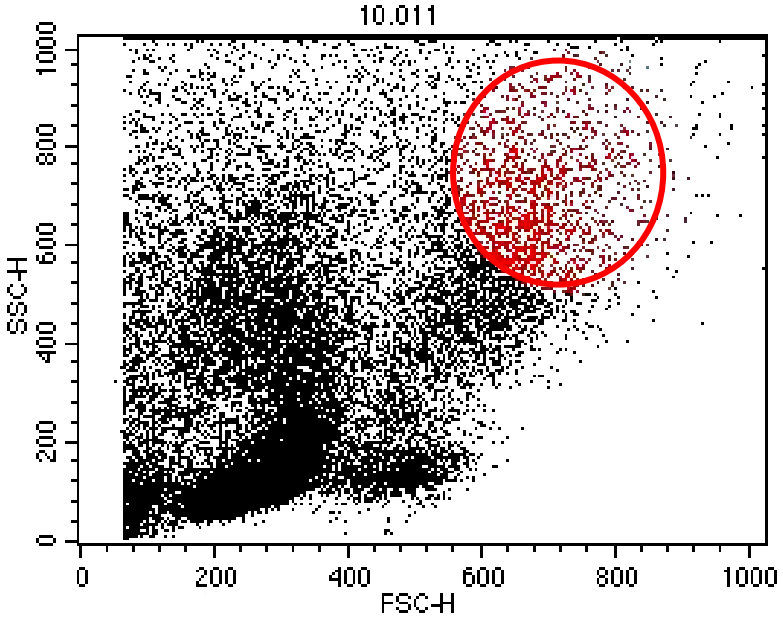


Figura 18 – Citograma de leucócitos peritoneias de frangos de corte com 42 dias de vida, sendo que a área circulada em vermelho representa os macrófagos peritoneais marcados com KUL-01, utilizados nos experimentos

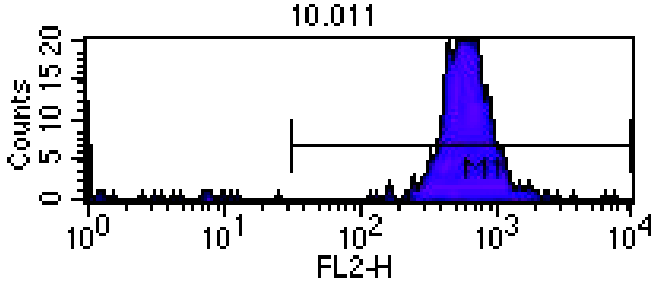


Figura 19 – Histograma de macrófagos peritonenais marcados com KUL-01

Tabela 10 – Avaliação da fagocitose de macrófagos peritoneais de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

FAGOCITOSE	**C_1**	**E_1 (36±1ºC)**
Intensidade	85.06±24.14	92.10±27.78
Porcentagem	89.77±10.10	88.20±10.92

Os dados representam a média ± desvio padrão de N=10 animais/grupo. p>0,05, em relação ao controle. Teste "t" de Student

Tabela 11 – Avaliação da fagocitose de macrófagos peritoneais de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

PARÂMETROS	**C_1**	**E_1 (36±1ºC)**
Burst Oxidativo basal	628.90 ± 315.40	532.06 ± 226.89
Burst Oxidativo na presença de *S.aureus*	525.97 ± 221.11	320,74±78,28*

Os dados representam a média ± desvio padrão de N=10 animais/grupo. *p<0,05, em relação ao controle. Teste "t" de Student.

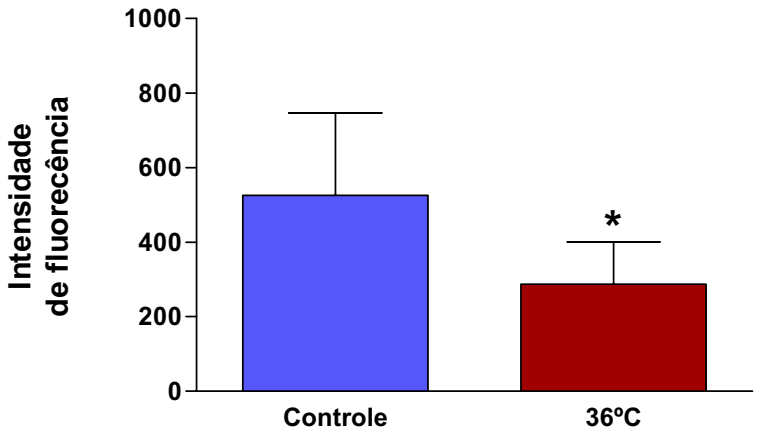


Figura 20 – Burst Oxidativo induzido em macrófagos pela fagocitose de S. aureus. Os dados referem-se à intensidade de fluorescência, de frangos de corte submetidos ou não ao estresse térmico por calor (36±1ºC). N=10 animais/grupo. *p<0,05 em relação ao grupo controle. Teste "t" de Student

5.5 EXPERIMENTO 5 – Avaliação do hemograma, dos níveis séricos de corticosterona e da atividade de macrófagos peritoneais de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (31±1ºC) do 35° ao 41° dia de vida

Foram utilizados 120 frangos divididos ao acaso em 2 grupos iguais C_2 e E_2, conforme descrito em 4.4.1. Os animais do grupo controle (C_2) permaneceram em temperatura termoneutra do primeiro ao 42º dia de vida, e o do grupo experimental (E_2) em temperatura a 31±1ºC, produzindo-se desta forma um estresse térmico, conforme descrito no item 5.3.1. Para analise de macrófagos peritoneais, no 40º dia de vida dos animais, selecionamos uma amostra de aves (item 4.4.3.) para injeção de Sephadex G50, conforme descrito em 4.4.8; no 42º dia de vida, os animais foram eutanaziados para a colheita do lavado peritoneal como descrito no item 4.4.8; posteriormente, foi realizada sua analise como descrito no item 4.4.9. Para analise dos níveis de corticosterona, os frangos foram separados randomicamente como no item 4.4.3; posteriormente, foi realizada a coleta de sangue para dosagens do hormônio, como descrito em 4.4.5. A figura 16 este protocolo experimental.

Resultados

O estresse térmico por calor (31 ±1ºC) aplicado por uma semana (35º ao 41º dia de vida das aves) não interferiu com a quantidade de hemácias, com hematócrito e com o número de leucócitos; os valores obtidos encontravam-se todos dentro dos parâmetros hematológicos considerados como sendo normais para frangos de corte (Tabela 7). A tabela 12 mostra os resultados obtidos nesse procedimento.

Tabela 12 – Avaliação do hemograma em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (31±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

PARÂMETROS	C_2	E_2 (31±1ºC)
Eritrócitos (10^6µl)	2,44±0,47	2,41±0,57
Hematócrito (%)	27±2,58	27,8±2,7
Leucócitos (10^3µl)	10,75±2,90	10,25±2,65
Heterófilos (10^3µl)	3,48±1,42	3,42±1,11
Linfócitos (10^3µl)	6,75±1,58	6,19±1,57
Monócitos (10^3µl)	0,25±0,18	0,29±0,14
Eosinófilos (10^3µl)	0,45±0,32	0,6±0,40
Heterófilo/Linfócitos	0,50±0,14	0,56±0,16

Os dados representam a média ± desvio padrão de N=10 animais/grupo. Teste "t" de Student.

Em relação os níveis séricos de corticosterona, observamos aumento estatisticamente significante (U=98,00, p<0,001) das amostras colhidas dos frangos submetidos à temperatura de 31±1°C quando comparados com os do grupo controle. A tabela 13 mostra e a figura 21 ilustra os resultados desse procedimento.

Tabela 13 – Avaliação dos níveis séricos de corticosterona de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (31±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

Parâmetro	C_2	E_2 (31±1°C)
Corticosterona	39,83±10,94	92,69±27,38**

**p<0,01. Teste de Mann-Whitney. n=10 animais/grupo

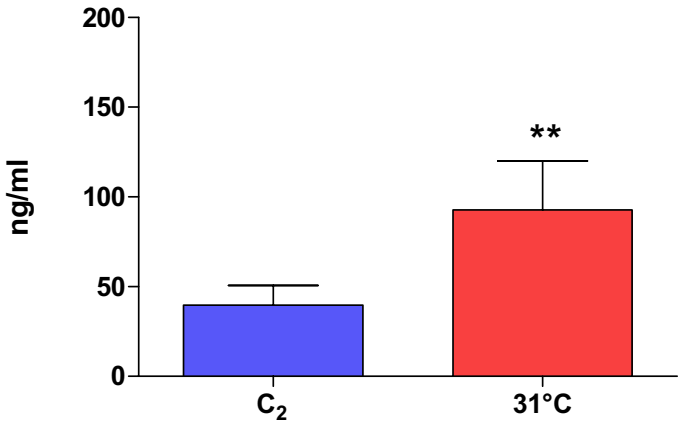


Figura 21 – Avaliação dos níveis séricos de corticosterona de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (31±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida. **p<0,01 em relação ao grupo controle, teste de Mann-Whitney. n=10 animais/grupo

Neste experimento, também analisamos a atividade de macrófagos peritoneais de frangos de corte. A fenotipagem dessas células foi realizada através do marcador KUL-01, tendo-se identificado a população de macrófagos peritoneais; sendo que obtivemos uma média maior que 90% de marcação na área selecionada para análise (Apêndice D). Esses valores foram repetidos em todos os experimentos em que se usaram os macrófagos peritoneais.

Com relação à atividade de macrófagos, mensuramos o *Burst* Oxidativo basal dessas células, o *Burst* Oxidativo induzido pela Fagocitose e a Fagocitose (intensidade e porcentagem). Não encontramos diferenças estatísticas nos valores referentes à Fagocitose (intensidade e porcentagem); porém, observamos diferenças quanto ao *Burst* Oxidativo Basal ($t=2,517$; $p<0,05$) e *Burst* Oxidativo induzido pela fagocitose ($U(134,76)=79$; $p<0,05$). As tabelas 14 e 15 mostram os valores e as figuras 22 e 23 os ilustram.

Tabela 14 – Avaliação da fagocitose de macrófagos peritoneais de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (31±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

FAGOCITOSE	**C $_2$**	**E $_2$ (31±1ºC)**
Intensidade	83.98±46.96	69.72±25.98
Porcentagem	95.00±4.10	94.58±5.10

Os dados representam a média ± desvio padrão de N=10 animais/grupo. p>0,05, em relação ao controle. Teste "t" de Student.

Tabela 15 – Avaliação da fagocitose de macrófagos peritoneais de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (31±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

PARÂMETROS	**C $_2$**	**E $_2$ (31±1ºC)**
Burst Oxidativo basal	549.98±196.66	373.35±102.82*
Burst Oxidativo na presença de *S.aureus*	449.51±221.25	253.63±99.41*

Os dados representam a média ± desvio padrão de N=10 animais/grupo. *p<0,05, em relação ao controle. Teste "t" de Student (paramétrico). Teste de Mann-Whitney (não paramétrico)

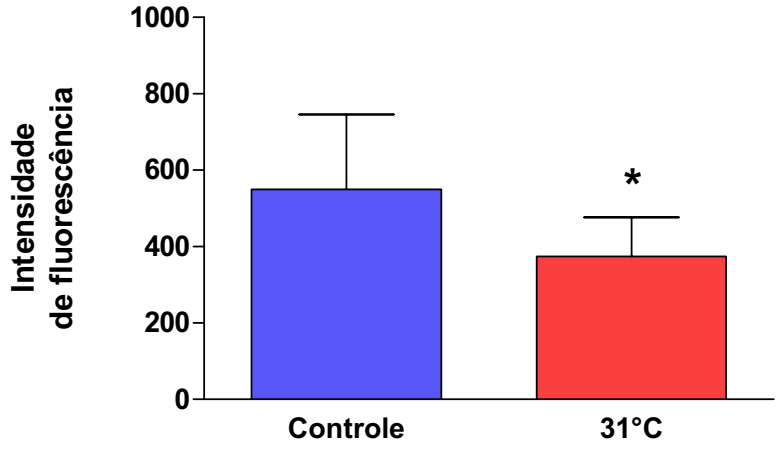


Figura 22 – *Burst* Oxidativo basal em macrófagos peritoneais. Os dados referem-se à intensidade de fluorescência, de frangos de corte machos submetidos ou não ao estresse térmico por calor (31±1ºC). N=10 animais/grupo. *p<0,05 em relação ao grupo controle. Teste "t" de Student

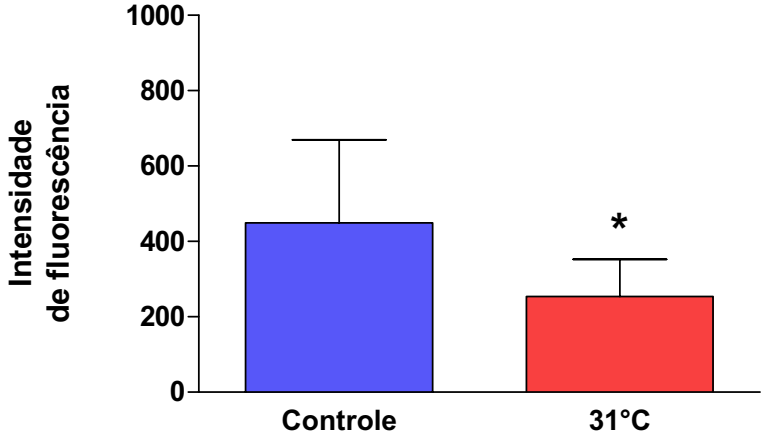


Figura 23 – *Burst* Oxidativo induzido em macrófagos pela fagocitose de S. aureus. Os dados referem-se à intensidade de fluorescência, de frangos de corte machos submetidos ou não ao estresse térmico por calor (31±1ºC). N=10 animais/grupo. *p<0,05 em relação ao grupo controle. Teste de Mann-Whitney

5.6 EXPERIMENTO 6 – Avaliação do hemograma, dos níveis séricos de corticosterona e da atividade de macrófagos peritoneais em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC) do 35° ao 41° dia de vida

Foram utilizados 120 frangos divididos ao acaso em 2 grupos iguais C_3 e E_3, conforme descrito em 4.4.1. Os animais do grupo controle (C_3) permaneceram em temperatura termoneutra do primeiro ao 42º dia de vida, e os do grupo experimental (E_3) em temperatura a 26±1ºC, produzindo-se desta forma um estresse térmico, conforme descrito no item 5.3.1. Para analise de macrófagos peritoneais, no 40º dia de vida dos animais, selecionamos uma amostra de aves (item 4.4.3.) para injeção de Sephadex G50, conforme descrito em 4.4.8; no 42º dia de vida, os animais foram eutanaziados para a colheita do lavado peritoneal como descrito no item 4.4.8; posteriormente, foi realizada sua analise como descrito no item 4.4.9. Para analise dos níveis de corticosterona, os frangos foram separados randomicamente como no item 4.4.3 e, posteriormente, foi realizada a coleta de sangue como descrito em 4.4.5. A figura 16 este protocolo experimental.

Resultados

O estresse térmico por calor (26 ±1ºC) por uma semana (35º ao 41º dia de vida das aves) não interferiu com a quantidade de hemácias, com hematócrito e com o número de leucócitos; todos os valores observados encontravam-se dentro dos parâmetros hematológicos considerados normais como sendo normais para frangos de corte (Tabela 7). A tabela 16 mostra os resultados obtidos nesse procedimento.

Tabela 16 – Avaliação do hemograma em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

PARÂMETROS	C_3	E_3 (26±1ºC)
Eritrócitos (10^6µl)	2,57±0,50	2,77±0,42
Hematocrito (%)	27,33±1,88	29,12±2,52
Leucócitos (10^3µl)	11,55±2,84	13,12±6,51
Heterófilos (10^3µl)	3,50±1,42	3,8±2,23
Linfócitos (10^3µl)	6,75±1,58	7,17±1,19
Monócitos (10^3µl)	0,24±0,14	0,21±0,08
Eosinófilos (10^3µl)	0,45±0,5	0,62±0,40
Heterófilo/Linfócitos	0,50±0,14	0,40±0,13

Os dados representam a média ± desvio padrão de N=10 animais/grupo. Teste "t" de Student.

Em relação os níveis séricos de corticosterona, não encontramos diferenças estatísticas ($p>0,05$) entre os dados provenientes de frangos submetidos à temperatura de 26±1°C e aqueles do grupo controle. A tabela 17 mostra os resultados desse procedimento.

Tabela 17 – Avaliação dos níveis séricos de corticosterona de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

Parâmetro	C_3	26±1°C
Corticosterona (ng/ml)	44,70±18,35	38,30±15,41

$p>0,05$. Teste de Mann-Whitney. n=10 animais/grupo

Neste experimento, também analisamos a atividade de macrófagos peritoneais de frangos de corte. A fenotipagem dessas células foi realizada através do marcador KUL-01, tendo-se identificado a população de macrófagos peritoneais; sendo que obtivemos uma média maior que 90% de marcação na área selecionada para análise (Apêndice D). Esses

valores foram repetidos em todos os experimentos em que se usaram os macrófagos peritoneais.

Com relação à atividade de macrófagos, mensuramos o *Burst* Oxidativo basal, o *Burst* Oxidativo induzido pela Fagocitose e a Fagocitose (intensidade e porcentagem) dessas células. Não encontramos diferenças estatísticas para nenhum dos parâmetros analisados. As tabelas 18 e 19 mostram os valores obtidos nesse experimento.

Tabela 18 – Avaliação da fagocitose de macrófagos peritoneais de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

FAGOCITOSE	**C $_3$**	**E $_3$ (26±1ºC)**
Intensidade	84,85±24,22	78,50±30,28
Porcentagem	90,68±11,17	93,91±4,83

Os dados representam a média ± desvio padrão de N=10 animais/grupo. p>0,05, em relação ao controle. Teste "t" de Student.

Tabela 19 – Avaliação da fagocitose de macrófagos peritoneais de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

PARÂMETROS	**C $_3$**	**E $_3$ (26±1ºC)**
Burst Oxidativo basal	586,91±244,76	621,07±199,82
Burst Oxidativo na presença de *S.aureus*	409,38±196,62	485,70±190,45

Os dados representam a média ± desvio padrão de N=10 animais/grupo. *p<0,05, em relação ao controle. Teste "t" de Student (paramétrico).

5. 7 Comparações entre os resultados obtidos nas temperaturas 36±1ºC, 31±1ºC e 26±1ºC

Após a análise dos resultados acima, realizamos uma comparação entre os dados provenientes dos grupos experimentais 1, 2, 3 e a media dos controles, a fim de avaliar as diferenças entre o estresse térmico por calor nas temperaturas de 36±1ºC, 31±1ºC e 26±1ºC. Utilizamos nesta comparação a média dos resultados dos diferentes grupos controles, pois não encontramos diferenças significantes ($p>0,05$) entre eles, isto é, entre os dados provenientes dos animais dos grupos controles utilizados em todos os experimentos realizados.

Com relação aos índices zootécnicos, observamos diferenças estatísticas entre os grupos estresse 36±1ºC e o grupo 31±1ºC, mais especificamente para os dados de ganho de peso ($F(3,26)=17,75$; $p<0,05$), conversão alimentar ($F(3,26)=6,80$; $p<0,05$). Não observamos diferenças estatísticas entre os grupos estresse 36±1ºC e o grupo 31±1ºC para o consumo de ração ($p>0,05$). Quando comparamos os grupos 36±1ºC com o grupo 26±1ºC, observamos diferenças estatísticas em todos os parâmetros: ganho de peso ($F(3,26)=17,75$; $p<0,001$), consumo de ração ($F(3,26)=23,79$; $p<0,01$) e CA $F(3,26)=6,80$; $p<0,05$). Agora, comparando-se o grupo 31±1ºC com o 26±1ºC apenas obtivemos diferenças estatísticas quanto ao ganho de peso ($F(3,26)=17,75$; $p<0,001$) e consumo de ração ($F(3,26)=23,79$; $p<0,01$). Porém, continuamos a observar, uma diminuição estatisticamente significante no ganho de peso ($F(3,26)=17,75$; $p<0,001$), no consumo de ração ($F(3,26)=23,79$; $p<0,001$) e um aumento da conversão alimentar das aves ($F(3,26)=6,80$; $p<0,05$) mantidas a 36±1ºC em relação aquelas do grupo controle (C_M). Observamos, também, diminuição no ganho de peso ($F(3,26)= 17,75$; $p<0,05$) e no consumo de ração ($F(3,26)=23,79$; $p<0,01$) quando comparamos os grupos experimental 31±1ºC e o grupo controle (C_M); e não observamos diferenças estatísticas para nenhum parâmetro quando comparamos o grupo 26±1ºC com o

grupo controle (C_M). A tabela 20 mostra os resultados obtidos nessa analise e as figuras 24, 25 e 26 os ilustram.

Tabela 20 – Comparação dos índices zootécnicos em frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

ÍNDICES ZOOTÉCNICOS	C_M	E_3 (26±1ºC)	E_2 (31±1ºC)	E_1 (36±1ºC)
Ganho de peso (g)	591,121±66,54[1]	569,37±54,55[1]	442,46±44,80[2]	347,72± 109,70[3]
Consumo de ração (g)	1438,00±87,49[1]	1364.00±6,86[1]	1138,83±84,47[2]	1137,3±117,62[2]
Conversão alimentar	2,46 ± 0,32[1]	2,40 ± 0,16[1]	2.51 ± 0.20[1]	3,52 ± 1,03[2]

Os dados representam a média ± desvio padrão de N=5 lotes/grupo, sendo cada lote=12 animais. Os números diferentes em sobrescrito significam diferenças estatísticas significantes pelo menos a $p<0,05$. Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer.

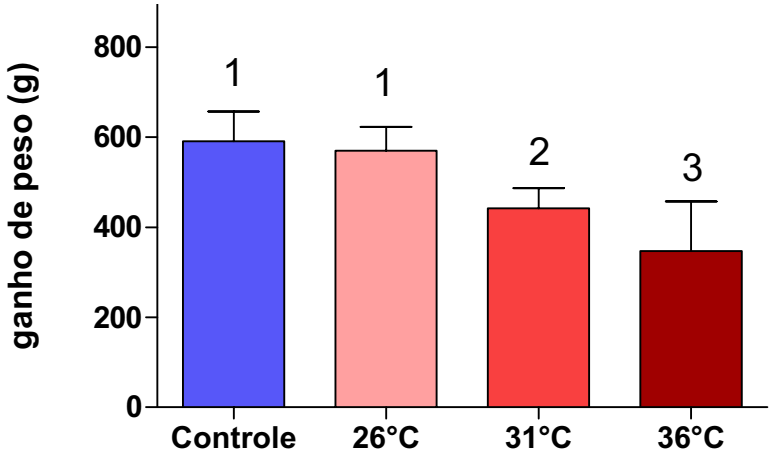


Figura 24 – Efeitos do estresse térmico por calor (26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC) do 35º ao 41º dia sobre o ganho de peso (g) de frangos de corte machos. Os dados representam a média ± desvio padrão. N=5 lotes/grupo, sendo cada lote=12 animais. Números diferentes em sobrescrito significam diferenças estatísticas significantes (p<0,05). Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer

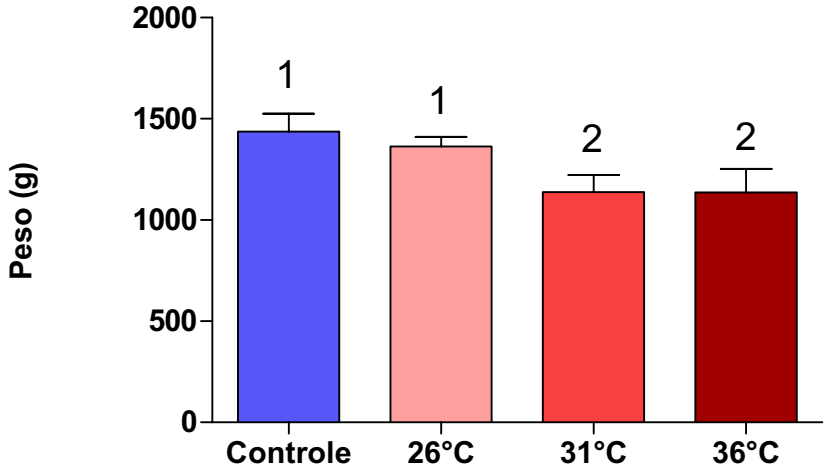


Figura 25 – Efeitos do estresse térmico por calor (31±1ºC e 36±1ºC) do 35º ao 42º dia sobre o consumo de ração (g) de frangos de corte machos. Os dados representam a média ± desvio padrão. N=5 lotes/grupo, sendo cada lote=12 animais. Números diferentes em sobrescrito significam diferenças estatísticas significantes (p<0,01). Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer

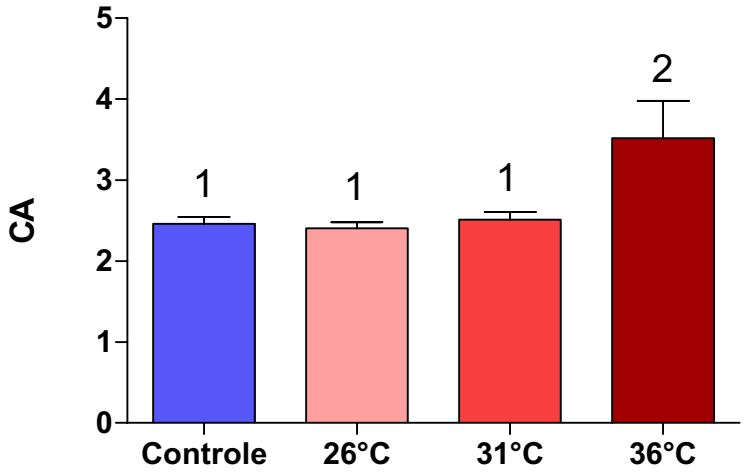


Figura 26 – Efeitos do estresse térmico por calor (26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC) do 35º ao 42º dia sobre a conversão alimentar (CA) de frangos de corte machos. Os dados representam a média ± desvio padrão. N=5 lotes/grupo, sendo cada lote=12 animais. Números diferentes em sobrescrito significam diferenças estatísticas significantes ($p<0,05$). Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer

Com relação aos pesos relativos dos órgãos linfóides, não obtivemos diferenças estatísticas entre os grupos experimentais 36±1ºC e 31±1ºC e entre os grupos 31±1ºC e 26±1ºC, mais especificamente quanto ao peso do timo, baço e bursa de Fabrícius ($p>0,05$). Porém, quando comparamos os grupos 36±1ºC e 26±1ºC, encontramos diminuição estatística no peso relativo da bursa ($F(3,56)=12,36$; $p<0,05$) e do timo ($F(3,56)=9,40$; $P<0,01$). Obtivemos, também diminuição estatisticamente significante no peso do timo ($F(3,56)=9,40$; $p<0,001$) e da bursa ($F(3,56)=12,36$; $p<0,001$), dos animais do grupo experimental 36±1ºC em relação ao controle (C_M). Observamos diminuição estatística no peso das bursas ($F(3,56)=12,36$; $p<0,05$) provenientes dos frangos do grupo experimental 31±1ºC em relação ao grupo controle (C_M); e não observamos diferenças estatísticas no peso relativo de nenhum órgão linfóide analisado, quando comparamos o grupo 26±1ºC com o grupo controle (C_M). A tabela 21 mostra os resultados obtidos nessa analise e as figuras 27 e 28 os ilustram.

Tabela 21 – Avaliação dos órgãos linfóides de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

ORGÃOS LINFÓIDES	C_M	E_3 (26±1ºC)	E_2 (31±1ºC)	E_1 (36±1ºC)
TIMO	0,58±0,10	0,57 ± 0,066	$0,52±0,07^{1,2}$	$0,42±0,06^{2}$
BAÇO	0,096±0,02	0,078 ± 0,014	$0,08±0,02^{1}$	$0,07±0,02^{1}$
BURSA	0,227±0,05	0.195 ± 0.064	$0,15±0,05^{2}$	$0,12±0,04^{2}$

Os dados representam a média ± desvio padrão de N=10 animais/grupo Os números diferentes em sobrescrito significam diferenças estatísticas significantes (p<0,01). Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer.

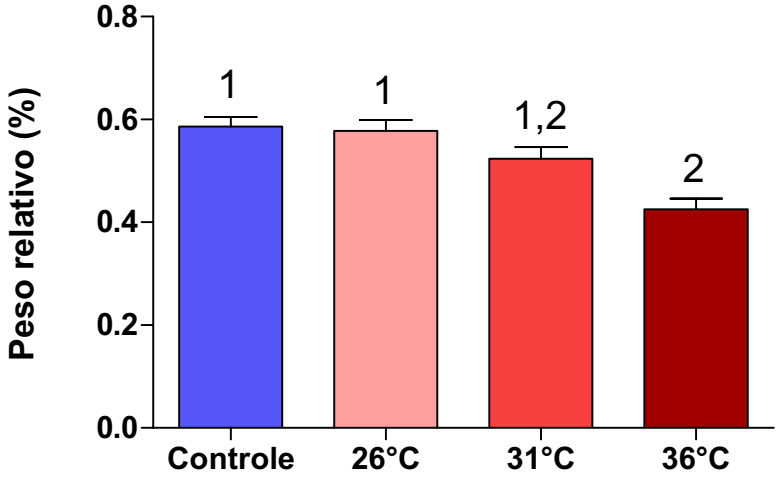


Figura 27 – Efeitos do estresse térmico por calor (26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC) do 35º ao 41º dia sobre o peso relativo (%) do timo de frangos de corte machos. Os dados representam a média ± desvio padrão de N=10 animais/grupo. Números diferentes em sobrescrito significam diferenças estatísticas significantes (p<0,01). Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer

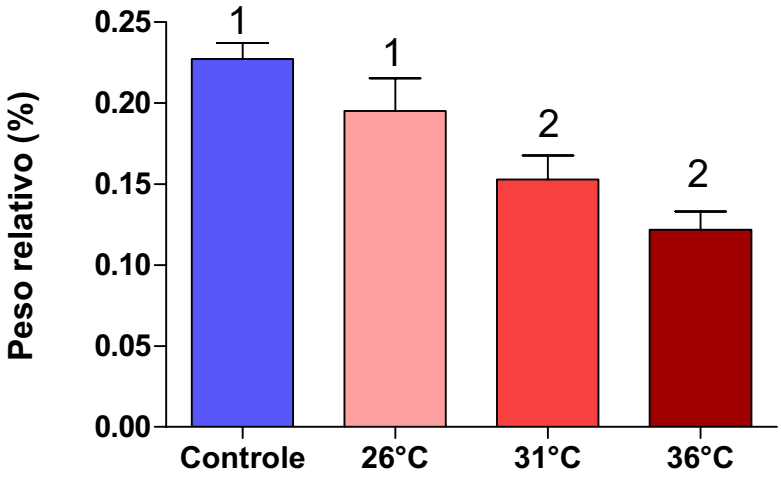


Figura 28 – Efeitos do estresse térmico por calor (26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC) do 35 º ao 41º dia sobre o peso relativo (%) da bursa de Fabrícius de frangos de corte machos. N=10 animais/grupo Números diferentes em sobrescrito significam diferenças estatísticas significam diferenças estatísticas significantes ($p<0,01$). Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer

Com relação ao hemograma não obtivemos nenhuma diferença estatística ao compararmos os grupos experimentais (36±1ºC, 31±1ºC e 26±1ºC) e o grupo controle (C_M). A tabela 22 mostra os resultados obtidos nessa analise.

Tabela 22 – Comparação do hemograma em frangos de corte, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

PARÂMETROS	C_M	E_3 (26±1ºC)	E_2 (31±1ºC)	E_1 (36±1ºC)
Eritrócitos (10^6µl)	2,5±0,46	2,77±0,42	2,41±0,57	2,80±0,33
Hematocrito (%)	27.2±2,28	29,12±2,52	27,8±2,7	28,20±1,61
Leucócitos (10^3µl)	11,03±2,71	13,12±6,51	10,25±2,65	10,85±2,92
Heterófilos (10^3µl)	3,49±1,36	3,8±2,23	3,42±1,11	3,34±10,33
Linfócitos (10^3µl)	6,76±1,52	7,17±1,19	6,19±1,57	6,87±2,14
Monócitos (10^3µl)	0,25±0,15	0,21±0,08	0,29±0,14	0,35±0,19
Eosinófilos (10^3µl)	0,45±0,45	0,62±0,40	0,06±0,40	0,5±0,22
Heterófilo/Linfócitos	0,50±0,14	0,40±0,13	0,56±0,16	0,50±0,14

Os dados representam a média ± desvio padrão de N=10 animais/grupo. P>0,05 em relação aos grupos. Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer.

Ao compararmos os resultados obtidos na avaliação da atividade de macrófagos peritoneais, observamos uma diminuição no *Burst* oxidativo basal ($F(3,56)=3,04$; $p<0,05$) e no *Burst* oxidativo na presença de SAPI ($F(3,56)=4,29$; $p<0,05$) das aves do grupo 31°C com relação ao grupo C_M e ao grupo 26±1ºC. Como mostra a tabela 24 e ilustram as figuras 29 e 30. Não observamos diferenças estatísticas entre os outros grupos e os outros parâmetros analisados (intensidade e porcentagem de fagocitose) (Tabela 23).

Tabela 23 – Avaliação da Fagocitose de macrófagos peritoneais de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

FAGOCITOSE	**C $_M$**	**E $_3$ (26±1ºC)**	**E $_2$ (31±1ºC)**	**E $_3$ (36±1ºC)**
Intensidade	84,63±32,36[1]	78,50±30,28[1]	69.72±25.98[1]	92.10±27.78[1]
Porcentagem	93,93±4,74[1]	93,91±4,83[1]	94.58±5.10[1]	88.20±10.92[1]

Os dados representam a média ± desvio padrão de N=10 animais/grupo. Os números diferentes em sobrescrito significam diferenças estatísticas significantes ($p<0,05$). Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer.

Tabela 24 – Avaliação da Fagocitose de macrófagos peritoneais de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

PARÂMETROS	**C $_M$**	**E $_3$ (26±1ºC)**	**E $_2$ (31±1ºC)**	**E $_1$ (36±1ºC)**
Burst basal	602,03±247,63[1]	621,07±199,82[1]	373.35±102.82[2]	532.06±226.89[1,2]
Burst na presença de *S.aureus*	463,70±212,26[1]	485,70±190,45[1]	253.63±99.41[2]	320,74±78,28[1,2]

Os dados representam a média ± desvio padrão de N=10 animais/grupo. Os números diferentes em sobrescrito significam diferenças estatísticas significantes ($p<0,01$). Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer.

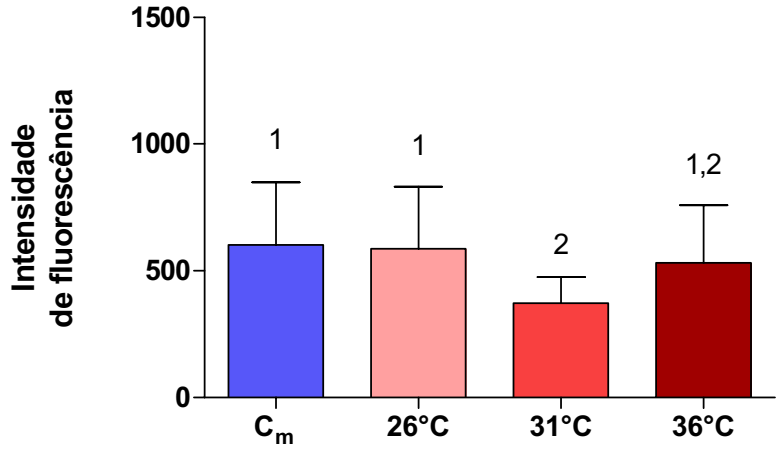


Figura 29 – *Burst* Oxidativo basal em macrófagos peritoneais. Os dados referem-se à intensidade de fluorescência de macrófagos provenientes de frangos de corte, submetidos ou não ao estresse térmico por calor (26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC). N=10 animais/grupo. Números diferentes em sobrescrito significam diferenças estatísticas significantes. Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer

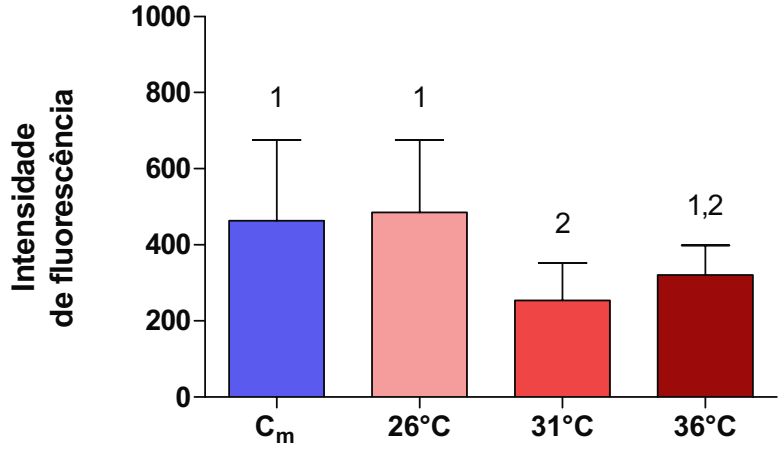


Figura 30 – Burst Oxidativo induzido em macrófagos pela fagocitose de *S. aureus*. Os dados referem-se à intensidade de fluorescência de macrófagos provenientes de frangos de corte, submetidos ou não ao estresse térmico por calor (26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC). N=10 animais/grupo. Números diferentes em sobrescrito significam diferenças estatísticas significantes. *p<0,05 em relação aos grupos. Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer

Em relação aos níveis séricos de corticosterona, encontramos um aumento estatisticamente significante nos grupos 31±1ºC e 36±1ºC quando comparados com os grupos 26 e C_M (KW=32,28, p<0,001). Não encontramos diferenças estatísticas entre os grupos 31±1ºC e 36±1ºC e entre os grupos 26±1ºC e o C_M. A tabela 25 mostra os resultados obtidos nessa analise e a figura 31 o ilustra.

Tabela 25 – Avaliação dos níveis séricos de corticosterona de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

Parâmetro	C_M	E_3 (26±1ºC)	E_2 (31±1ºC)	E_1 (36±1ºC)
Corticosterona (ng/ml)	46,08±16,82[1]	38,30±15,41[1]	92,69±27,38[2]	109,59±42,78[2]

Os dados representam a média ± desvio padrão de N=10 animais/grupo Os números diferentes em sobrescrito significam diferenças estatísticas significantes (p<0,01). Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer.

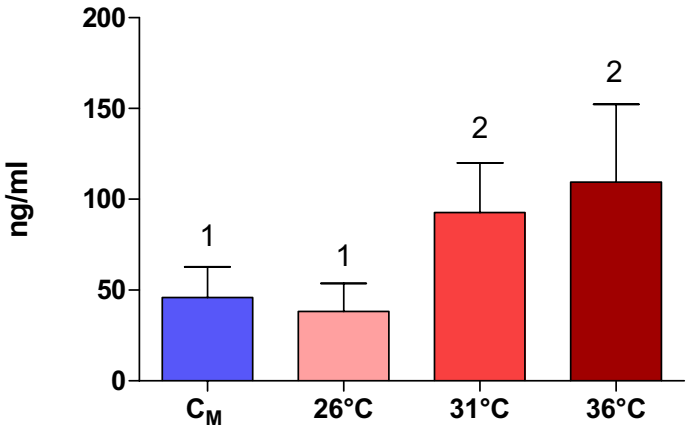


Figura 31 – Avaliação dos níveis séricos de corticosterona de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida. N=10 animais/grupo. Números diferentes em sobrescrito significam diferenças estatísticas significantes. p<0,01 em relação aos grupos. Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn de comparações múltiplas

No exame microscópico do intestino delgado, mais especificamente em jejuno, observamos que os estresses de 31±1ºC e de 36±1ºC foram capazes de causar enterite discreta, porém, esses estresses não modificaram o comprimento das vilosidades e a morfologia das criptas. Observamos, também, a presença de um importante infiltrado linfocitico plasmocitico na lamina própria (Figura 32 e 33). Foi possível observar em algumas amostras a presença de heterófilos na lamina própria, porém não observamos diferenças estatísticas (Figura 34). Em nenhuma amostra encontramos parasitas intestinais. As figuras 35, 36, 37, 38, 39, 40 e 41 ilustram esses resultados

Não se encontraram diferenças estatísticas para relação vilo/cripta, comprimento da vilosidade, morfologia de cripta, densidade de linfócitos intra-epiteliais, heterófilos e eosinófilos quando da avaliação semiquantitativa. (Apêndice A, B e C). O ambiente de 26±1ºC não foi capaz de alterar nenhum parâmetro analisado na avaliação semiquantitativa.

Quando avaliamos duodeno e íleo, não observamos diferenças estatísticas para nenhum parâmetro histopatológico avaliado (Apêndice A, B e C).

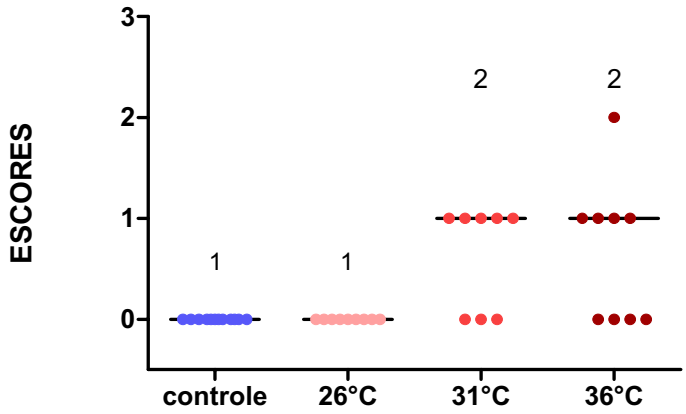


Figura 32 – Análise semiquantitativa da mucosa do jejuno de frangos de corte submetidos ou não ao estresse térmico de 26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC: analise do infiltrado inflamatório. N=10 animais/grupo. A linha interna representa a mediana e as marcas circulares os valores individuais. Números diferentes em sobrescrito significam diferenças estatísticas significantes (p<0,01). Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn de comparações múltiplas

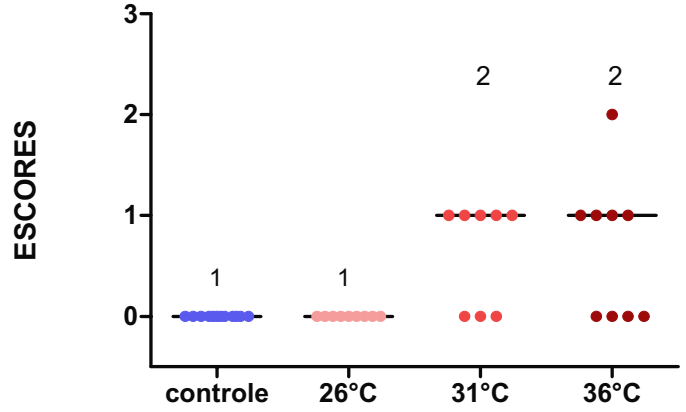


Figura 33 – Análise semiquantitativa da mucosa do jejuno de frangos de corte submetidos ou não ao estresse térmico de 26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC: análise do infiltrado de mononucleares. N=10 animais/grupo. A linha interna representa à mediana e as marcas circulares os valores individuais. Números diferentes em sobrescrito significam diferenças estatísticas significantes (p<0,01). Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn de comparações múltiplas

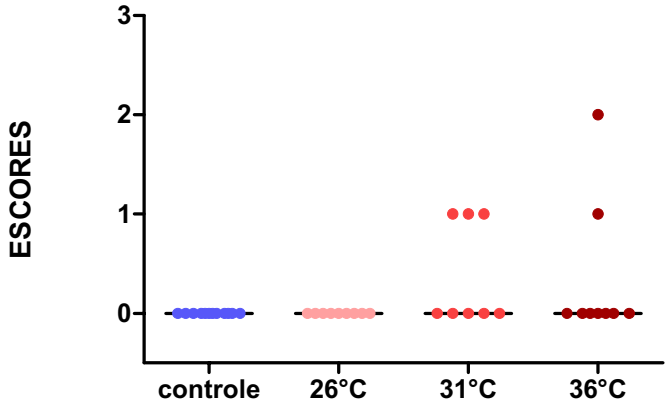


Figura 34 – Análise semiquantitativa da mucosa do jejuno de frangos de corte submetidos ou não ao estresse térmico de 26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC: analise de heterófilos. N=10 animais/grupo. A linha interna representa à mediana e as marcas circulares os valores individuais. Não obtivemos diferenças estatísticas entre os grupos (p>0,05). Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn de comparações múltiplas

Figura 35 – Fotomicrografia do jejuno de frangos de corte controle, com 42 dias de vida. Estrutura de vilos (A) e criptas (B) dentro da normalidade, e ausência de infiltrado linfo-plasmocitario na lamina própria. Letra C indica camada muscular. HE, 40x

Figura 36 – Fotomicrografia do jejuno de frangos de corte controle, com 42 dias de vida. Vilosidade com ausência de infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário na lamina própria (LP). Letra D representa região epitelial. HE, 200x

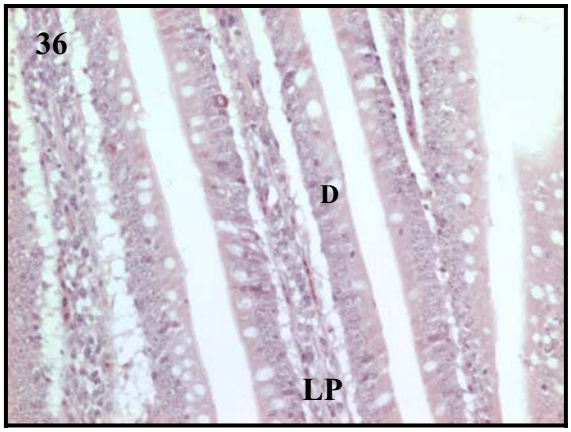
Figura 37 – Fotomicrografia do jejuno de frangos de corte submetidos a estresse de 31±1°C, com 42 dias de vida. Presença de infiltrado linfo-plasmocitário na lamina própria (LP), caracterizando enterite discreta. Seta indica heterófilo na lamina própria (LP) e letra D indica região epitelial. HE, 200x

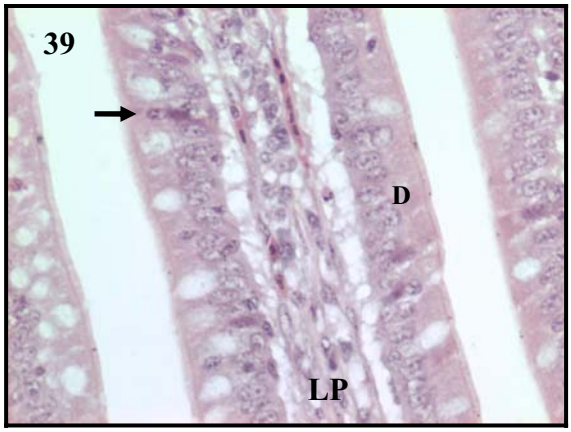
Figura 38 – Fotomicrografia do jejuno de frangos de corte submetidos a estresse de 36±1°C, com 42 dias de vida. Presença de infiltrado linfo-plasmocitário na lamina própria (LP), caracterizando enterite discreta. Seta indica heterófilo na lamina própria (LP) e letra D indica região epitelial. HE, 200x

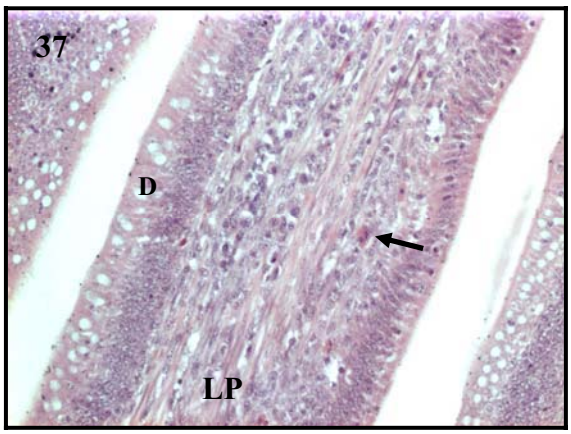
Figura 39 – Fotomicrografia do jejuno de frangos de corte controle. Estrutura normal de lamina própria (LP). Vilosidade com ausência de infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário na lamina própria (LP). Letra D representa região epitelial. Seta indica linfócito intraepitelia HE, 400x

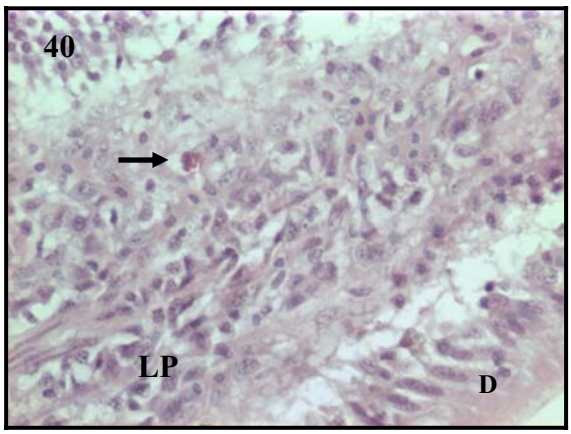
Figura 40 – Fotomicrografia do jejuno de frangos de corte submetidos a estresse de 31±1°C, com 42 dias de vida. Presença de infiltrado linfo-plasmocitário na lamina própria (LP), caracterizando enterite discreta. Seta indica heterófilo na lamina própria (LP) e letra D indica região epitelial. HE, 400x

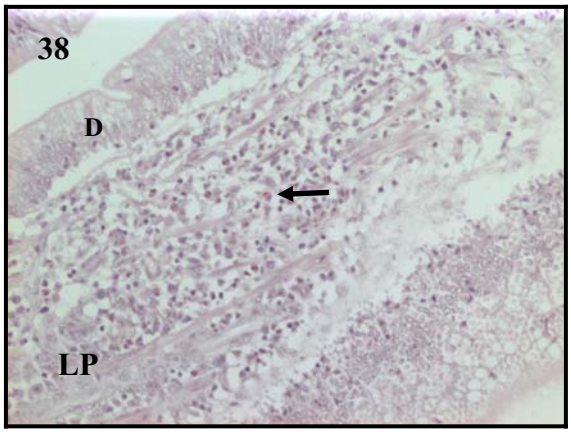
Figura 41 – Fotomicrografia do jejuno de frangos de corte submetidos a estresse de 36±1°C, com 42 dias de vida. Presença de infiltrado linfo-plasmocitário na lamina própria (LP), caracterizando enterite discreta. Seta indica heterófilo na lamina própria (LP) e letra D indica região epitelial. HE, 400x

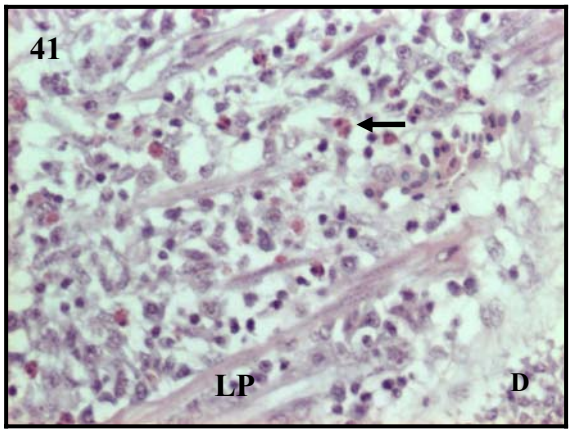

36
D
LP


39
D
LP


37
D
LP


40
LP
D


38
D
LP


41
LP
D

6 DISCUSSÃO

Os presentes resultados mostram que o estresse térmico por calor foi capaz de alterar o desempenho das aves, o peso dos órgãos linfóides, a atividade de macrófagos peritoneais e a integridade intestinal. De fato, o estresse por calor, nas temperaturas de 31±1ºC e 36±1ºC aplicado do 35° ao 41° dia de vida dos animais: **1** – diminuiu o ganho de peso e o consumo de ração, porém só observamos diminuição da conversão alimentar e da mortalidade nas aves submetidas a estresse de 36±1ºC; **2** – não foi capaz de interferir com os resultados do hemograma; **3** – não foi capaz de interferir com o peso relativo do baço, entretanto, diminuiu o peso relativo da bursa de Fabrícius; apenas a temperatura de 36±1ºC diminuiu o peso relativo do timo; **4** – diminuiu o *burst* oxidativo basal de macrófagos, porém apenas a temperatura de 31±1ºC foi capaz de diminuir o *burst* oxidativo desses macrófagos na presença de *S. aureus*. **5** – aumentou os níveis séricos de corticosterona; **6** – alterou a estrutura do intestino delgado, mais especificamente a região do jejuno em que se observou um aumento de infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleares.

Com relação aos dados referentes aos animais submetidos à temperatura de 26±1ºC, não encontramos diferenças estatísticas para nenhum dos parâmetros estudados quando comparados aos obtidos nas aves do grupo controle. Dessa forma, acreditamos que essa variação de temperatura não seja suficiente para causar transtornos fisiológicos relevantes, principalmente na esfera dos índices zootécnicos e dos parâmetros neuroimunes aqui analisados. De fato, outros pesquisadores têm considerado a temperatura de 26°C ou valores próximos a ele como sendo termoneutra e a usam como temperatura controle (ROZENBOIM et al., 2007).

Uma vez que os experimentos foram realizados *in vivo*, para entender os possíveis efeitos do estresse térmico por calor (31±1ºC, 36±1ºC), é necessário que se considere

preliminarmente a atuação do estresse sobre a resposta neuroimune e, posteriormente, sua relação com o desempenho, o peso relativo dos órgãos linfóides, o hemograma, a atividade dos macrófagos e a integridade intestinal dos frangos de corte.

O Sistema Nervoso Central é o principal controlador e interprete dos efeitos de fatores estressantes sobre as respostas comportamentais e fisiológicas. O SNC é assim, o primeiro alvo do estresse, seguido pelos sistemas endócrino, sistema cardiovascular e sistema imune, cujas alterações, sabidamente, são comunicantes (MCEWEN, 2000).

Para começarmos a abordar os efeitos de um estresse por calor, faz-se necessário uma definição da palavra estresse, uma vez que a mesma apresenta diversos significados. A palavra estresse quer dizer "pressão", "tensão" ou "insistência", portanto, estar estressado quer dizer "estar sob pressão" ou "estar sob a ação de estímulo insistente". No dicionário da Língua Portuguesa de “Aurélio Buarque de Hollanda” a palavra estresse é definida como: “um conjunto de reações do organismo a agressões de origem diversas, capazes de perturbar-lhe o equilíbrio interno”. Por várias vezes essa palavra tem sido colocada na literatura para se referir a uma condição que provocou a resposta (estímulo estressor ou simplesmente estressor), ou para se referir às mudanças na homeostasia do organismo induzidas por uma condição externa (reposta ao estresse propriamente dita). É relativamente comum ver o uso da palavra estresse empregada tanto para se referir ao estímulo estressor como à resposta induzida pelo estímulo estressor. Assim, para o propósito desta discussão, um estressor é definido como sendo “qualquer estímulo (psicológico, ambiental, comportamental ou imunológico) capaz de provocar uma resposta fisiológica de estresse, com aumento de níveis de glicocorticóides” (MCEWEN, 2005). As conseqüências desta resposta são geralmente adaptativas em curto prazo (DHABHAR; MCEWEN, 1996, 1997); porém, podem ser prejudiciais quando o estímulo estressor se mantém por um período crônico (DHABHAR; MCEWEN, 1997; MCEWEN, 1998).

Sabe-se hoje, que os sistemas neuroendócrino e imune atuando de forma coordenada regulam as funções imunes por meio de mecanismos aditivos, sinérgicos ou até mesmo antagônicos. A natureza bidirecional destas interações é exemplificada, como já comentado, pelas habilidades que têm o sistema imune de produzir neurotransmissores e neuropeptídeos comumente encontrados no SNC e o Sistema Nervoso Central de produzir citocinas, mediadores de processos imune/inflamatórios (GANEA, 1996; GARZA; CARR, 1997; REUL et al., 1998).

É de se acreditar, portanto, que indivíduos portadores de desordens neurológicas tenham uma resposta imune alterada quando comparada com aquela de indivíduos sadios. Assim, pacientes psicóticos, ansiosos ou deprimidos (BARTROP et al., 1977), bem como outros estressados emocionalmente (SOLOMON; AMKRANT, 1981) ou portadores de tumores cerebrais, mostraram tanto uma reatividade linfocitária prejudicada como uma diminuição da produção de anticorpos. Portanto, podemos inferir, que a combinação de fatores de natureza estressante, infecciosa e emocional (como por exemplo: tensão e competição) podem debilitar a saúde do indivíduo (LAWRENCE; KIM, 2000).

Neste contexto, não seria de se estranhar que o estresse também alterasse a homeostase de animais de produção, mais especificamente em suínos e aves. De fato, o estresse térmico por calor é uma grande preocupação para aqueles que trabalham com animais de produção (frangos de corte e postura) por causa da baixa taxa de crescimento, imunossupressão e alta mortalidade que produz (BOTTJE; HARRISON, 1985; MASHALY et al.; 2004; FURLAN, 2006). Este tipo de estresse é capaz de induzir uma diminuição no peso do timo e no número de linfócitos T circulantes (GUO; GU, 1988). De fato, nossos dados mostram uma diminuição no peso do timo dos animais expostos a estresse calórico de 36±1 °C, porém não observamos diferenças no numero de linfócitos circulantes após esse estresse por calor. A exposição a altas temperaturas ambientes modifica vários componentes da função imune como, por

exemplo, número de células T e NK (*Natural* Killer), secreção de citocinas, proliferação de linfócitos e concentração de imunoglobulinas (SHEPHARD, 1998).

Acredita-se que o estresse térmico em animais de produção (frangos de corte), ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (MASHALY et al., 1998).

Neste sentido, o hipotálamo, parece ser o local do cérebro responsável por "vários caminhos" neuroendócrinos que regulam as funções imunes; de fato, o principal "desencadeador" do processo imunoregulatório regulado pelo eixo hipotálamo – pituitária – adrenal é o Hormônio Liberador de Corticotropina (CRH). O produto final imunosupressivo desta cascata é o cortisol em humanos e hamsters e a corticosterona em outros roedores e em aves (LAWRENCE; KIM, 2000); estes glicocorticóides, sabidamente regulam os processos inflamatórios/imunológicos (MCEWEN et al., 1997). Neste sentido, sabe-se que, a ativação do eixo hipotálamo – pituitária – adrenal por agentes internos como IL-1 (DUNN, 1995) ou externos como estresse térmico em animais de produção (ZULKLIF et al., 2000) ou, ainda, pela administração de fármacos, como por exemplo, piretróides do tipo II (RIGHI; PALERMO-NETO, 2003, 2005) ou picrotoxina (STANKEVICIUS et al., 2008) e, a conseqüente liberação de ACTH e de glicocorticóides modula as respostas neurovegetativas ligadas às situações de estresse e de ansiedade (GRAEFF, 1989). Os dados agora obtidos sugerem que um possível aumento nos níveis de glicorticóides induzido pelo calor tenha atuado nos órgãos linfóides das aves, e com isso produzido a diminuição do peso do timo e da bursa, agora observada após esse estresse. De fato, e em geral, os quadros de estresse manifestam-se com diferentes graus de involução do sistema linforreticular. A liberação de corticosterona pode ocasionar a involução do tecido linfóide (timo, bursa de Fabrício e baço) e a supressão da imunidade humoral e celular (ROSALES et al., 1989; LAGANÁ et al., 2007). Nossos dados mostram, nesse sentido, um aumento dos níveis de corticosterona sérica quando os animais foram submetidos a estresse de 36±1°C e 31±1°C.

Em adição ao eixo HPA, o Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNAS) também é ativado em situações de estresse, regulando, entre outras funções, o sistema imune em níveis regionais, locais e sistêmicos (ESKANDARI; STERNBERG, 2002). Neste sentido, órgãos linfóides primários e secundários, incluindo-se aqui a medula óssea, o timo, o baço, os linfonodos, e exclusivamente em aves a Bursa de Fabricius são inervados por terminações nervosas do SNAS (YANG; GLASER, 2002; MASHALY et al., 2004). Assim, a diminuição agora observada no peso do timo e da bursa (órgãos linfóides) poderia ter sido, também, conseqüência de efeitos do estresse por calor na atividade do SNAS, sendo, assim, teria sido mediado através de ações da adrenalina e noradrenalina.

Os sistemas nervoso, endócrino e imune estão intimamente relacionados com o desempenho produtivo de frangos de corte. De fato, um animal em perfeito estado físico, com "controle" de sua homeostase, é capaz de direcionar toda sua reserva energética para, "o crescimento". Os presentes dados mostram uma queda no crescimento dos frangos na ultima semana de produção (35º a 42º dia de vida) quando submetidos ao estresse térmico por calor: obtivemos uma diminuição no ganho de peso, e no consumo de ração e um aumento na conversão alimentar e na mortalidade dos animais submetidos a 36±1ºC. Esses resultados foram repetidos na temperatura de 31±1ºC apenas para ganho de peso e consumo de ração. Houve, desta forma, queda do desempenho produtivo após o estresse térmico.

Nossos resultados corroboram, assim, com aqueles de Mashaly et al. (2004), que mostraram que galinhas poedeiras adultas apresentavam uma diminuição do peso corpóreo e do consumo de ração quando expostas a calor de 35ºC. Além do mais, foi observado um aumento da mortalidade dos animais submetidos ao calor em comparação tanto com aves de um grupo controle (23ºC) como com outras mantidas em temperatura cíclica (23 a 35ºC).

No mesmo sentido, Scoot e Balnave (1988) já haviam mostrado uma diminuição no peso corpóreo de poedeiras expostas a uma elevada temperatura ambiente. Ainda, nesta linha

de pensamento, a redução no consumo alimentar em função do estresse por calor já havia sido descrita por outros autores (MCKEE et al., 1997; KIRUNDA et al., 2001). Podemos ainda citar outros estudos que mostraram ser o aumento de temperatura (42±3ºC) por 12 horas e por 6 dias em galinhas poedeiras com 31 semanas de vida, capaz de diminuir o ganho de peso e o consumo de ração em relação a animais de um grupo controle (24 a 26ºC) (ROZENBOIM et al., 2007). Nesse sentido, a corticosterona, principal hormônio do estresse, quando administrada exogenamente a frangos de corte foi capaz de diminuir a "*performance*" e o crescimentos das aves (LIN et al., 2006). Outros pesquisadores mostraram diminuição no ganho de peso de aves que foram submetidas a um tratamento com corticosterona exógena, tratamento esse que mimetizava situações semelhantes às do estresse (SHINI et al., 2008). Além do ganho de peso, esses autores observaram, ainda, e após o tratamento, um aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona e da razão heterófilos/linfócitos, dados que sugeriam a existência de uma situação equivalente àquela induzida pelo de estresse. Post, Rebel e ter Huuner (2003), também, mostraram que administrações de corticosterona via água de bebida produzia uma redução do crescimento das aves.

Como é sabido, o consumo de alimento (energia) durante o verão é significativamente menor em comparação com aquele realizado no inverno. O efeito da temperatura ambiente sobre o consumo alimentar, está relacionado a ajustes na ingestão de alimentos com alto teor de energia pelas aves, o que é feito para atender às exigências de manutenção da temperatura corpórea em consonância com as necessidades impostas pelo meio ambiente (FURLAN, 2006). Como os requerimentos de energia para a manutenção da temperatura dos animais decrescem com o aumento da temperatura ambiente, as aves precisam ingerir menos alimento para satisfazer suas necessidades energéticas (DAGHIR, 1995). Contudo, esta relação é verdadeira somente dentro da zona termoneutra, pois em temperaturas mais baixas há um aumento no consumo e em altas temperaturas uma redução no consumo de alimentos. De fato,

mostrou-se que acima de 30° C, o consumo decresce rapidamente e as exigências energéticas aumentam, devido à necessidade que as aves têm de eliminar calor (FURLAN, 2006). Portanto, um menor consumo de alimento e um menor gasto de energia para manutenção da homeostase térmica, levam a uma redução no desempenho das aves criadas em altas temperaturas. Bertechini et al. (1991) observaram que frangos mantidos em diferentes temperaturas ambientes (17,1°C, 22,2°C, e 27,9°C) recebendo rações com 2800, 3000 e 3200 Kcal EM/kg, reduziram a ingestão de ração e, conseqüentemente, tiveram menor ganho de peso, à medida que a temperatura foi sendo elevada. Kerhavarz e Fuller (1980) estudaram variações de temperatura mantidas em ciclos de frio (1.7 a 12.8°C), de quente (23.9 a 35°C), e normal (12.8 a 23.9°C), tendo verificado que o ganho de peso corporal era menor para as aves mantidas em temperaturas quentes. Nesse sentido, as perdas econômicas provocadas pelo calor são especialmente importantes, pois ocorrem, freqüentemente, quando os frangos estão próximos de serem comercializados (FURLAN, 2006).

A queda agora relatada do crescimento dos frangos estressados poderia estar também relacionada aos efeitos da corticosterona sobre a saciedade alimentar e sobre o transito gastrointestinal; de fato, e como já comentado, mostrou-se que os glicocorticóides exógenos influenciam esses parâmetros em aves (BARTOV et al., 1980; TUR et al., 1989). Lin et al. (2004, 2006) sugeriram que quando o consumo de alimento é expresso em termos de saciedade alimentar absoluta, as aves tratadas com corticosterona comem menos que as do grupo controle na primeira semana de tratamento; no entanto, quando o consumo de alimento é expresso pela eficiência alimentar, aves tratadas com corticosterona necessitaram de mais alimento para atingir o mesmo peso em relação às do grupo controle. Os dados de Lin et al. (2006) concordam com observações de Davison et al. (1983) o que os levou a concluir que a análise da eficiência alimentar de aves tratadas com corticosterona é difícil, uma vez que a perda de peso pode estar relacionada tanto um aumento do gasto energético como uma

redução dos depósitos de gordura. Nesse sentido, Siegel e Van Kampen (1984) mostraram na vigência de um estresse, que a produção de energia é fundamental para que os animais se adaptem ao estimulo estressor.

Nossos resultados mostraram que os frangos de corte estressados tiveram queda no consumo de alimento e queda no ganho de peso; dessa forma, podemos sugerir que o retardo do ganho de peso e a queda do peso corporal e dos órgãos linfóides estejam ligados diretamente aos efeitos do estresse sobre o redirecionamento do gasto energético com crescimento para a satisfação das respostas adaptativas ao estresse.

Na análise do hemograma não encontramos diferenças estatísticas quanto ao eritrograma, uma vez que os valores de hemácias e do hematôcrito estavam próximos dos valores de referencia para esses animais, não permitindo esse fato uma conclusão a respeito dos dados (Tabelas 7, 8, 12, 16 e 22). Outro parâmetro do hemograma, mais especificamente o leucograma, também, não mostrou diferenças estatísticas entre os dados dos grupos experimentais e aqueles dos grupos controles, ficando os achados experimentais nos limites dos intervalos de referencia. Outros autores, no entanto, foram capazes de observar diminuição na contagem de leucócitos totais em poedeiras expostas ao calor (35ºC por 4 semanas) (MASHALY et al., 2004). Borges et al. (2004) analisando os efeitos de um aumento progressivo de temperatura em frangos (32°C/30 mim, 36°C/30 mim, 37°C/15 mim e 41°C/45 mim) dos 42-44 dias, mostraram ser essa variável capaz de produzir diminuição no numero de linfócitos circulantes e desbalanço eletrolítico em aves, porém obtiveram um aumento de heterófilos em relação ao grupo controle. Uma das respostas fisiológicas ao estresse que explicaria nossos achados seria aquela que mostra que um aumento dos níveis de glicocorticóides produziria redistribuição dos linfócitos do sangue para os órgãos linfóides produzindo, conseqüentemente, linfopenia; essa assertiva, no entanto, não foi avaliada em nossos experimentos.

O estresse em aves já foi, também, relacionado com alterações na razão heterófilos/linfócitos. (MASHALY et al., 2004). De fato, essa razão mostrou-se elevada em animais submetidos a inúmeros tipos de estresse por calor (ALTAN et al., 2003; BORGES et al., 2004); os achados dos diversos experimentos realizados, porém, não encontram unanimidade na literatura. Essa discrepância depende, muito provavelmente, ao período de vida em que os animais foram estressados, ao tempo de exposição ao estresse e ao tipo de estresse empregado (MASHALY et al., 2004; SHINI et al., 2008). Em nosso trabalho, não encontramos diferenças estatísticas na razão heterófilos/linfócitos quando submetemos as aves aos diferentes tipos de estresse por calor. Assim, em função das contradições da literatura e pelo fato de a análise do hemograma das aves ser influenciada por variáveis, como idade, sexo, espécie, materiais utilizados na técnica de análise, e o próprio observador, não ficamos surpresos em não encontrar diferenças em nas nossas análises de hemograma; essa idéia já havia sido discutida e apresentada por outros autores (CARDOSO; TESSARI, 2003; MASHALY et al., 2004).

Em estudos clássicos realizados com estresse por Hans Seyle mostraram que o estresse – uma síndrome decorrente da exposição de um animal a um conjunto muito diversificado de estímulos nocivos que incluía exposição ao frio, injúria tecidual, excesso de exercícios e intoxicações – causava uma hipertrofia das glândulas adrenais, aparecimento de úlceras gástricas e, curiosamente para a época, atrofia de órgãos linfóides como timo, baço e linfonodos (REICHE; NUNES; MORIMOTO, 2004). Essa síndrome classicamente conhecida como Síndrome da Adaptação Geral, foi apresentada em detalhes na revisão de literatura deste relatório e não será aqui registrada. Nossos dados, de forma já esperada, concordam com os achados de Seyle (1955). O estresse por calor foi capaz de diminuir o peso relativo dos órgãos linfóides de frangos de corte. De fato, o estresse por calor a 31±1ºC e 36±1ºC diminuiu o peso relativo da bursa, um dos mais importantes órgãos linfóides das aves. Porém, apenas a

temperatura de 36±1ºC foi capaz de diminuir o peso relativo de timo dos animais. Diferentemente, não encontramos diminuição significante no tamanho do baço das aves. Heckert et al. (2002), nesse sentido, mostraram que frangos submetidos a uma superlotação (aumento de densidade populacional) apresentaram uma diminuição da atividade imune. Observaram também que o aumento da densidade populacional (20 aves/m²) diminuiu significantemente o peso total e o peso relativo da bursa de Fabricius (comparados ao grupo controle com 10 aves/m²). Estudos que mimetizaram situações de estresse com corticosterona ou ACTH exógenos mostraram uma diminuição no peso relativo da bursa e do timo de aves, sugerindo esses dados a participação dos glicorticóides na involução desses órgãos linfóides à semelhança do que ocorre na vigência de um estresse (PUVADOLPIROD; THAXTON, 2000; POST; REBEL; TER HUURNE, 2003; SHINI et al., 2008).

De tudo quanto exposto, podemos sugerir que o estresse por calor tenha alterado a homeostase dos animais, diminuindo seu crescimento e o peso de seus órgãos linfóides, via liberação de corticosterona, pois esta foi aumentada pelo estresse que empregamos. Uma vez que a corticosterona é elo central nas manifestações neuroimunes induzidas pelo estresse, quer nos parecer de grande importância discutir também o papel do estresse por calor em frangos esta esfera. Observamos que os estresses de 36±1°C e 31±1°C foram capazes de diminuir a atividade de macrófagos peritoneais, porém apenas o estresse de 31±1°C foi capaz de diminuir tanto o *burst* oxidativo basal como o induzido por SAPI. Nossos dados corroboram com os achados de Bartlett e Smith (2003), que demonstraram que flutuações diárias da temperatura ambiente (23,9°C/12h, 23,9-37°C/3h, 37°C/6h e 37-23,9°C/3h) do 21° até 34° dia de vida do frango diminuem o percentual de fagocitose de hemácias de carneiro realizada por macrófagos peritoneais. Esses autores, também, relacionaram os efeitos que encontraram com os níveis de zinco na dieta, sendo que as altas concentrações desse mineral aumentavam o percentual de fagocitose dos macrófagos. Entretanto, experimentos adicionais do mesmo

grupo mostraram que suplementação da dieta com zinco não foi capaz de reverter o efeito observado nas aves submetidas ao estresse térmico indicando, desta forma, que outro fator além da composição da dieta estaria relacionado com os efeitos do estresse térmico sobre a atividade dos macrófagos. Em nosso trabalho, o estresse de 36±1°C, mesmo sendo mais intenso, não diminuiu a atividade de macrófagos como o estresse de 31±1°C; esse achado curioso e inesperado poderia estar relacionado ao fato de os frangos de corte terem sido selecionados pelo calor excessivo, isto é, apenas as aves imunologicamente mais resistentes ao efeitos do estresse (e que não morreram) foram usadas para coleta dos macrófagos.

Como já mencionado, acreditamos que o estresse estaria atuando sobre o sistema imune da ave via ativação do eixo HPA, e liberação de corticosterona. Nossos dados mostram que os estresses de 31±1°C e 36±1°C foram capazes de aumentar os níveis séricos de corticosterona em frangos de corte em relação às aves do grupo controle. Como os glicocorticóides estão envolvidos com processos inflamatórios/imunológicos (MCEWEN et al., 1997), pode-se sugerir que as alterações encontradas na atividade dos macrófagos possam ter sido induzidas pelo estresse via ativação do eixo HPA, isto é, através da liberação de corticosterona. O estresse atuaria em neurônios ligados a receptores térmicos, presentes no SNC que enviaria um sinal ao hipotálamo que, por sua vez ativaria toda a cascata de liberação de glicocorticóides, atuando, assim, indiretamente sobre a atividade das células imunes e dos órgãos linfóides.

É de amplo conhecimento a associação intima que existe entre as atividades do SNC e do SI. Estudos ligados à neuroimunomodulação têm apresentado inúmeras evidencias das relações de reciprocidade entre os mesmos. Inúmeros trabalhos mostraram, em seres humanos, os efeitos de estressores físicos e/ou psicológicos sobre a resposta imune (ADER et al., 1991; BESEDOVSKY; DEL REY, 1996; MILLER, 1998). Do mesmo modo, já se relatou a capacidade que apresentam os estressores de modificar a resposta imune de animais de

laboratório. Assim, por exemplo, a aplicação de um choque elétrico nas patas, aumentou a susceptibilidade de camundongos ao vírus *Herpes simplex* (KUSNECOV et al., 1992); um estresse sonoro foi capaz se suprimir as respostas mediadas por linfócitos T e B (SOBRIAN et al., 1997); um choque elétrico aplicado de forma inescapável nas patas aumentou o numero de células encontradas no lavado broncoalveolar de ratos sensibilizados com ovoalbumina (PORTELA et al., 2001); estressores de natureza física e psicológica foram capazes de diminuir tanto a atividade de macrófagos peritoneais ativados por onco-BCG como a resistência de camundongos ao tumor de Ehrlich (PALERMO-NETO et al., 2003). Neste ultimo trabalho, mostrou-se que esta redução de imunidade estava inversamente correlacionada aos níveis de ansiedade apresentados pelos camundongos, como avaliada através do campo aberto, do labirinto em cruz elevado e dos próprios níveis de corticosterona.

Quando observamos a resposta imune de aves frente a estímulos estressores, verificamos que frangos submetidos a um estresse por contenção apresentam queda na atividade de células NK, sugerindo esse fato que o aumento dos níveis de corticosterona esteja de fato envolvido com atividade de células ligadas à imunidade inata (KUSHIMA et al., 2003). Khajavi et al. (2003), em estudos conduzidos com estresse térmico por calor (39±1°C) por 7h/dia do 35º ao 41º dia de vida das aves, obtiveram diminuição do numero de células CD4+, CD8+ e dos títulos de anticorpos para hemácias de carneiro. Outros autores mostraram que a administração de corticosterona diminui a resposta vacinal ao vírus da Bronquite Infecciosa das galinhas e queda dos títulos de anticorpos para hemácias de carneiro (POST; REBEL, TER HUURNE, 2003; SHIMI et al., 2008)

Uma das primeiras manifestações do estresse acontece no âmbito do sistema gastrointestinal com o aparecimento de lesões gástricas e intestinais (COSEN-BINKER et al., 2004). A manutenção da morfologia normal e da integridade estrutural do intestino delgado é importante para a prevenção da translocação de bactérias pelo trato intestinal e para uma

perfeita absorção dos nutrientes fornecidos pela alimentação. O estresse nutricional causa efeitos deletérios ao epitélio intestinal, mais especificamente, reduz o tamanho dos vilos e a profundidade das criptas (YAMAUCHI et al., 1995, 1996). Aves submetidas ao estresse agudo por calor (30°C por 24h) mostraram uma redução na profundidade das criptas do íleo, quando comparadas com aves de um grupo controle (23°C). Porém, a altura dos vilos, e a relação vilo/cripta, não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (BURKHOLDER et al., 2008).

Nossos resultados mostram, de igual forma, que os estresses por calor a 31±1°C e a 36±1°C não foram capazes de alterar a estrutura dos vilos e das criptas. Sugerimos, dessa forma, que o não aparecimento de lesões na morfologia dos vilos e das criptas seja conseqüência da rápida re-epitelização da mucosa intestinal. De fato, em menos de 36h, toda a estrutura epitelial é substituída; dessa forma, análises dos efeitos de estressores, poderiam, eventualmente, ter sido realizadas em momento em que não se evidencia atrofia de vilos e/ou hipertrofia de criptas (MACARI; MALHEIROS; FURLAN, 2005; BURKHOLDER et al., 2008).

Outro fator relevante que foi por nós observado, na região do jejuno, refere-se a um aumento de infiltrado inflamatório com predomínio de células monucleares, caracterizando uma enterite. Encontramos, em algumas amostras, um aumento do número de heterófilos o que, mesmo não atingindo diferenças estatísticas, remete à ocorrência de uma possível infecção bacteriana. O aumento de infiltrado inflamatório, nesse sentido, poderia ter contribuido para o aumento de liberação de citocinas pro-inflamatórias que atuam nas “tight junction” do epitélio intestinal, aumentando a permeabilidade da mucosa às bactérias patogênicas (AL-SADI; MA, 2007; AL-SADI et al., 2008). Desta forma, podemos sugerir que esse aumento da permeabilidade intestinal poderia facilitar a transposição de bactérias patogênicas, podendo aumentar a incidência de doenças bacterianas intestinais. Além das

alterações da integridade intestinal, o estresse teria ainda atuado, modificando, a microbiota natural do intestino, que por sua vez, protege o hospedeiro contra a colonização de patógenos pela competição no sitio de ligações entre as células intestinais, pela demanda de nutrientes e pela produção de bactericinas; de fato, sabe-se que perturbações no equilíbrio da microbiota intestinal podem diminuir os mecanismos de proteção contra a invasão de bactérias patogênicas, como por exemplo, a *Salmonella* sp. (BURKHOLDER et al., 2008).

O frango de corte está sujeito a uma serie de fatores que podem alterar as características morfofuncionais da mucosa do trato intestinal; nesse sentido, lesões ulcerativas, enterites inespecíficas, lesões por microorganismos e lesões mecânicas afetam o turnover celular do epitélio intestinal, podendo induzir alterações funcionais, em especial nos mecanismos absortivos de nutrientes (MACARI; MALHEIROS; FURLAN, 2005).

Inúmeros trabalhos realizados em nossos laboratórios mostraram a importância da imunidade inata em situações de estresse, sejam eles de natureza física, psicológica, ou induzida por fármacos (PALERMO-NETO et al., 2003; SÁ-ROCHA; SÁ-ROCHA; PALERMO-NETO, 2006; SAKAI et al., 2006; PALERMO-NETO et al., 2008). Esses autores mostraram que o estresse diminui a atividade de neutrófilos e/ou macrófagos, aumentando o desenvolvimento de processos inflamatórios e/ou crescimento de tumores. Os dados apresentados nessa dissertação mostram de maneira semelhante que o estresse diminuiu a atividade de macrófagos colhidos do peritônio de frangos. Assim, pode-se supor que uma diminuição da imunidade inata esteja ocorrendo, também, a nível da mucosa do trato intestinal, levando esse fato a uma quebra da barreira imune do intestino, ocasionando a invasão de bactérias patogênicas, que associada às alterações da microbiota natural, facilitaria o desenvolvimento de processos inflamatórios, como os observados no atual trabalho. Esses processos inflamatórios discretos, quando desafiados por agentes de alta patogenicidade, podem não ser suficientes para conter o desenvolvimento de lesões graves (atrofia de vilos,

ulcera etc), visto que heterófilos, macrófagos, células NK e até mesmo linfócitos podem estar com suas atividades diminuídas em função do estresse.

Finalmente, e como já comentado, uma diminuição da atividade imune inata, poderia resultar em alterações da microbiota indígena do trato gastrointestinal das aves e, assim, alterar sua integridade e, com isso, a absorção de nutrientes; com isso, a transformação dos nutrientes em massa corpórea poderia estar diminuída. A diminuição do peso da bursa e do timo poderia estar relacionada com esse fato; essas estruturas são importantes na distribuição, diferenciação e maturação de células imunes. Nesse contexto, é relevante lembrar que algumas interleucinas como a IL-1 e a IL-6 liberadas na vigência de processos inflamatórios caem na circulação e atingem o SNC onde produzem comportamento doentio (JOHNSON, 1998; CONNOR et al., 2003; COHN et al., 2006). Um dos sintomas desse comportamento é inapetência; um efeito como esse poderia, também, justificar a redução do consumo de ração das aves estressadas pelo calor usadas nesse experimento.

Não encontramos diferenças estatísticas na quantidade de leucócitos no hemograma; isso não significa, porém e de forma alguma que a atividade dessas células imunes esteja normal. De fato, não se pode relacionar de maneira simplista o número de células imunes com sua atividade e sabe-se que estressores crônicos diminuem a imunidade adquirida, ao interferir com a atividade de linfócitos (WEBSTER-MARKETON; GLASER, 2008).

De tudo quanto exposto, podemos sugerir que o estresse via ativação do eixo HPA e subseqüente liberação de corticosterona, tenha diminuído o consumo alimentar e conseqüentemente diminuído o ganho de peso e a imunidade inata dos animais. Esta alteração neuroimune teria influenciado a qualidade da barreira imune intestinal, fato que teria possibilitado a migração de bactérias patogênicas para a mucosa intestinal e, via de conseqüência, o aparecimento do infiltrado inflamatório que observamos.

O fato de o estresse por calor ter diminuído o consumo de ração e o ganho de peso, não nos permite descartar o fato de que possíveis deficiências nutricionais ocorridas no presente experimento tenham prejudicado a atividade imune das aves (KLASING, 2007). Também, não podemos descartar a hipótese de uma possível ação do estresse por calor via SNAS, pela liberação catecolaminas visto que, como já comentado, descreve-se a participação desse sistema nas atividades neuroimunes induzidas por estresse em animais (NANCE; SANDERS, 2007). Esses fatos serão objetos de estudos já programados.

7 CONCLUSÕES

7.1 Conclusões específicas

O estresse térmico por calor, em frangos de corte:

- Produziu uma diminuição no ganho de peso e no consumo de ração, porém só diminuiu a conversão alimentar e aumentou a mortalidade das aves submetidas ao estresse de 36±1ºC.

- Não alterou os parâmetros hematológicos avaliados, isto é, o número de leucócitos, a contagem diferencial de leucócitos, o número de hemácias e o hematócrito.

- Não alterou o peso relativo do baço, mas diminuiu o peso relativo da bursa de Fabrícius; apenas o estresse de 36±1ºC diminuiu o peso relativo do timo.

- Aumentou os níveis séricos de corticosterona.

- Diminuiu a atividade de macrófagos peritoneais porém, apenas a temperatura de 31±1ºC foi capaz de diminuir o *burst* oxidativo basal e o *burst* oxidativo dessas células na presença de *S. aureus*.

- Alterou a estrutura do intestino delgado, mais especificamente a região do jejuno em que se observou um aumento de infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleares, características de uma enterite discreta.

7. 2 Conclusão Geral

Tomados em seu conjunto, nossos resultados sugerem que o estresse térmico por calor tenha produzido alterações na atividade neuroimune de frangos de corte, como evidenciado pela diminuição dos índices zootécnicos (ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar e mortalidade) e da imunidade inata; essas alterações poderiam estar relacionadas à atividade do eixo HPA, uma vez que observou-se aumento dos níveis séricos de corticosterona nos frangos de corte estressados pelo calor. Mais especificamente, sugerimos que a corticosterona teria reduzido diretamente o consumo de alimento e, conseqüentemente o ganho de peso. Esse glicorticoide teria, também, atuado sobre os macrófagos peritoneais diminuindo sua atividade *(Burst* basal e *Burst* com SAPI).

A diminuição da atividade de macrófagos peritoneais permite inferir ocorrência de uma diminuição da imunidade inata a nível intestinal, e, via de conseqüência, uma diminuição da eficácia da barreira imune presente nesse órgão. De fato, verificamos que o estresse térmico por calor prejudicou o aparecimento de um infiltrado inflamatório caracterizado por células mononucleares no jejuno das aves. A presença de um processo inflamatório como esse poderia resultar em alterações da microbiota indígena e da integridade do trato intestinal, com proliferação de agentes patogênicos. Essas alterações intestinais poderiam ter reduzido a absorção de nutrientes o que teria contribuído para a queda, induzida pelo calor, do ganho de peso dos animais.

Finalmente, fica claro a importância de controlar o bem-estar animal na Avicultura, não apenas pelo lado da proteção dos animais, mas também pela necessidade de se obterem melhores resultados produtivos e sanitários do plantel. Na atualidade, os mercados consumidores apresentam-se extremamente exigentes, buscando por produtos de boa qualidade, por melhores preços e, agora também, pelo bem-estar animal. Esta dissertação mostra não apenas que os animais e os consumidores se beneficiam com a aplicação das normas relativas ao conforto e de bem-estar dos animais, mas também e, principalmente os produtores. De fato, a manutenção dessas normas permite a obtenção de aves mais hígidas e imunologicamente mais competentes, nas quais todo metabolismo energético seria direcionado para o crescimento e para o ganho de peso.

REFERÊNCIAS

ADER, R. Psychosomatic and psychoimmunologic reserch. **Psychosomatic Medicine**, v. 42, p. 307-321, 1980.

ALLEN, P. C.; DANFORTH, H. D.; AUGUSTINE, P. C. Dietary modulation of avian coccidiosis. **International journal for parasitology,** v. 28 n. 7, p. 1131-1140, 1998.

AL-SADI, R.; MA, T. Y. IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. **Journal of Immunology,** v. 178, n. 7, p. 4641-4649, 2007.

AL-SADI, R.; YE, D.; DOKLADNY, K., MA, T. Y. Mechanism of IL-1beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. **Journal of Immunology**, v. 180, n. 8, p. 5653-5661, 2008.

ALTAN, O.; PABUCCUOGLU, A.; ALTAN, A.; KONYALIOGLU, S.; BAYRAKTAR, H. Effect of heat stress on oxidative stress, lipid peroxidation and some stress parameters in broilers. **British Poultry Science**, v. 44, p. 545-550, 2003.

BARTLETT, J. R.; SMITH, M. O. Effects of different levels of zinc on the performance and immunocompetence of broilers under heat stress. **Poultry Science**, v. 82, p. 1580-1588, 2003.

BARTOV, I.; JENSEN, L. S.; VELTMANN Jr, J. R. Effect of dietary protein and fat levels on fattening of corticosterone-injected broiler chicks. **Poultry Science**, v. 59, n. 8, p. 1864-1872, 1980.

BARTROP, R. W.; LUCKHURST, E.; LAZARUS, L.; KILOH, L. G.; PENNY, R. Depressed lymphocyte function after bereavement. **Lancet**, v. 16, n. 8016, p. 834-836, 1977.

BERTECHINI, A. G.; ROSTAGNO, H. S.; SILVA, M. A. Efeitos da temperatura ambiente e nível de energia da ração sobre o desempenho e a carcaça de frangos de corte. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 3, p. 219-229, 1991.

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

BIRGEL, E. H. Hematologia clinica veterinária. In: BIRGEL, E. H.; BENESI, F. J. (Ed.). **Patologia clinica veterinária**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982, p. 2-34.

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

BORGES, S. A.; FISCHER DA SILVA, A.V.; MAJORKA, A.; HOOGE, D. M.; CUMMINGS, K. R. Physiological responses of broiler chickens to heat stress and dietary electrolyte balance (sodium plus potassium minus chloride, milliequivalents per kilogram). **Poultry Science**, v. 83, n. 9, p. 1551-1558, 2004.

BOTTJE, W. G.; HARRISON, P. C. Effect of carbonated water on growth performance of cockerels subjected to constant and cyclic heat stress temperatures. **Poultry Science**, v. 64, p. 1285-1292, 1985.

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

CALOGERO, A. E.; BAGDY, G.; SZEMEREDI, K. Mechanisms of serotonin receptor agonsit-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. **Endocrinology**, v. 126, p. 1888-1894, 1990;

CALOGERO, A. E.; BERNARDINI, R.; MARGIORIS, A. N. Effects of serotonergic agonists and antagonists on corticotropin-releasing hormone secretions by explanted rat hypothalamic. **Peptides**, v. 10, p. 189-200, 1989.

CALOGERO, A. E.; GALLUCCI, W. T.; BERNARDINI, R. Effect of cholinergic agonists and antagonists on rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion *in vitro*. **Neuroendocrinology**, v. 125, p. 303-308, 1988.

CAMPBELL, T. W. A. Avien hematology. In: CAMPBELL, T. W. A . **Avian Hematology and Cytology**. (Ed.) Iowa: Iowastate University Press/AMES. 1988. P. 3-17.

CAMPOS, E. J. Programa de alimentação e nutrição para aves de acordo com o clima – Reprodutoras. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE AMBIÊNCIA E INSTALAÇÃO NA AGRICULTURA INDUSTRIAL, 1995, Campinas. **Livro de textos.** Campinas: FACTA, 1995. p. 251-257.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. Estudos dos parâmetros hematológicos em frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, p. 419-424, 2003.

CAST. Council for Agriculture Science and Technology. Ames: The Well-Being of Agriculture Animals, 1997. p. 32.

CHENG, H. W. The immunemodulatory effects of Clonidine, an α-2-Adrenergic Agonist, in Laying Hens. **Poultry Science,** v. 85, p. 452-456, 2006.

COHEN, S.; HERBERT, T. B. Health psychology: psychological factors and physical disease from the perspective of human psychoneuroimmunology. **Annual review of psychology**, v. 47, p.113-142, 1996.

COHN, D. W.; DE SA-ROCHA, L. C. effects of lipopolysaccharide in the social behavior of dominant and submissive mice. **Physiology & behavior**, v. 87, n. 5, p. 932-937. 2006.

COSEN-BINKER, L. I.; BINKER, M. G.; NEGRI, G.;TISCORNIA, O. Influence of stress in acute pancreatitis and correlation with stress-induced gastric ulcer. **Pancreatology**, v. 4, n. 5, p. 468-469, 2004.

DA SILVA, F. R.; LAZZARINI, R.; DE SA-ROCHA, L. C.; MORGULIS M. S.; DE OLIVEIRA MASSOCO, C.; PALERMO-NETO, J. Effects of acute and long-term diazepam administrations on neutrophil activity: a flow cytometric study. **European journal of pharmacology**, v. 478, n. 2/3, p. 97-104, 2003.

DAGHIR, N. J. **Poultry production in hot climates**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p.303.

DAVISON, T. F.; REA, J.; ROWELL, J. G. Effects of dietary corticosterone on the growth and metabolism of immature Gallus gallus domesticus. **General and comparative endocrinology**, v. 50, p. 463–468, 1983.

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

DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B. S. Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. **Journal of Immunolology**, v. 156, n. 7, p. 2608-2615, 1996.

DINAPOLI, M. R.; CALDERON, C. L.; LOPES, D. M. Phosphatidyl serine is involved in the reduced rate of transcription of the inducible nitric oxide synthase gene in macrophages from tumor-beating mice. **Journal of immunology**, v. 158, p. 1810–1817, 1997.

DUNN, A. J. Interactions between the nervous system and the immune system. In: BLOMM, F. E.; KUPFER, D.J. (Ed.). **Psychopharmacology:** the fourth generation of progress. Oxford: Raven Press, 1995. p. 719-731.

EDENS, F. W.; MCCORKLE, F. M.; SIMMONS, D. G.; YERSIN, A. G. Brain monoamine concentrations in turkey poults infected with Bordetella avium. **Avian diseases**, v. 31, n. 3, p. 504-508, 1987.

EDENS, F. W.; MCCORKLE, F. M.; SIMMONS, D. G.; YERSIN, A. G. Effects of Bordetella avium on lymphoid tissue monoamine concentrations in turkey poults. **Avian diseases**, v. 31, n. 4, p. 746-51. 1987

ESKANDARI, F.; STERNBERG, E. M. Neural-immune interactions in health and disease. **Annals of the New York Academy of Sciences,** v. 966, p. 20-27, 2002.

FECCHIO, D.; RUSSO, M.; SIROIS, P.; BRAQUET, P.; JANCAR, S. Inhibition of Ehrlich ascites tumor in vivo by PAF antagonists. **International journal of immunopharmacology,** v. 12, p. 57–65, 1990.

FEDULLO, D. **Clínica de animais silvestres: répteis, primatas e felinos**. Porto Alegre: ANCLIVEPA, 2001. Palestra proferida em 09 e 10/07/2001.

FRANCI, O.; AMICI, A.; MARGARIT, R.; MERENDINO, N.; PICCOLELLA, E. Influence of thermal and dietary stress on immune response of rabbits**. Journal of Animal Science**, v.74, n. 7, p.1523-1529, 1996.

FUJIHASHI, K.; KAWABATA, S.; HIROI, T.; YAMAMOTO, M.; MCGHEE, J.R. ; NISHIKAWA, S.; KIYONO, H. Interleukin 2 (IL-2) and interleukin 7 (IL-7) reciprocally induce IL-7 and IL-2 receptors on gamma delta T-cell receptor-positive intraepithelial lymphocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci.***, v.* 93, p. 3613–3618, 1996.

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

GANEA, D. Regulatory effects of vasoactiv intestinal peptide on cytokine productions in central and peripheral lymphoid organs. **Advances in neuroimmunology**, v. 6, p. 61-74, 1996.

GARRIGA, C.; HUNTER, R. R.; AMAT, C.; PLANAS, J. M.; MITCHELL, M. A.; MORETO, M. Heat stress increases apical glucose transport in the chicken jejunum. **American journal of physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 1, p. 195-201, 2006.

GARSSADI, S. I.; REGELY, K.; MANDI, Y.; BELADI, I. Inhibition of cytotoxicity of chicken granulocytes by serotonin and ketanserin. **Veterinary Immunology and**

Immunopathology, v. 41, p. 101-112, 1994.

GARZA Jr, H. H.; CARR, D. J. Neuroendocrine peptide receptors on cells of the immune system. **Chemical immunology,** v. 69, p. 132-154, 1997.

GASSNER, B.; WÜTHRICH, A.; SCHOLTYSIK, G.; SOLIOZ, M. The pyrethroids permethrin and cyhalothrin are potent inhibitors of the mitochondrial complex I. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,** v. 281, n. 2, p. 855-860, 1997.

GERAERT, P. A.; PADILHA, J. C. F.; GUILLAUMIN, S. Metabolic and endocrine changes induced by chronic heat exposure in broiler chickens: growth performance, body composition and energy retention. **British Journal of Nutrition**, v.75, p.195-204, 1996.

GLAC, W.; BORMAN, A.; BADTKE, P.; STOJEK, W.; ORLIKOWSKA, A.; TOKARSKI, J. Amphetamine enhances Natural Killer cytotoxic activity via beta-adrenergic mechanism. **Journal of Physiology and Pharmacology: an Official Journal of the Polish Physiological Society,** v. 57, p. 125-132. 2006. Supplement, 11.

GLICK, B. Symposium: currente advances in avian immunology: the bursa of Fabricius: the evolution of a discovery. **Poultry Science**., v. 73, p. 979-983, 1994.

GONZALEZ-ESQUERRA, R.; LESSON, S. Effects of acute versus chronic heat stress on broiler response to dietary protein. **Poultry Science**, v. 84, p. 1562-1569, 2005.

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.

GRAY, A.; CHIEN, Y.; PALLIWAL, I.; CARLBERG, K.; INSOGNA, K. Evidence for a functional association between phosphatidylinositol 3-kinase and c-src in the spreading response of osteoclasts to colony-stimulating factor-1. **Endocrinology**, v. 141, p. 2129-2138, 2000.

GOEHLER, L. E.; LYTE, M.; GAYKEMA, R. P. Infection-induced viscerosensory signals from the gut enhance anxiety: implications for psychoneuroimmunology. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 21, p. 721-726, 2007.

GUO, C. J.; GU, C. F. Changes in cellular immunity and nutritional status in mice after thermal injury. **Burns, Including Thermal Injury,** v. 14, p. 429-34. 1988.

GUPTA, S.; EARLEY, B.; CROWE, M. A. Pituitary, adrenal, immune and performance response of mature Holstein X Friesian bulls housed on slatted floors at various space allowances. **The Veterinary Journal**, v. 173, p. 594-604. 2007.

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, p. 451-457, 2002.

HODGES, R. D. The Digestive System. In: HODGES, R. D. **The Histology of the Fowl.** New York : Academic Press, 1974. p. 64-87.

HOHENDORFF, R. V. Aplicação e avaliação de enriquecimento ambiental na manutenção de bugio (*Alouatta spp* LACÉPEDE, 1799) no Parque Zoológico de Sapucaia do Sul–RS. 2003. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2003.

HOSSAIN, M. M.; SUZUKI, T.; SATO, I.; TAKEWAKI, T.; SUZUKI, K.; KOBAYASHI, H. The modulatory effect of pyrethroids on acetylcholine release in the hippocampus of freely moving rats. **Neurotoxicology**, v. 25, n. 5, p. 825-833, 2004.

HUBEL, K. A. Intestinal nerves and ion transport: stimuli, reflexes, and responses. **The American Journal of Physiology**, v. 248, p. 261-71, 1985.

IWAKABE, K.; SHIMADA, M.; OHTA, A.; YAHATA, T.; OHMI, Y..; HABU, S.; NISHIMURA, T. The restraint stress drives a shift in Th1/Th2 balance toward Th2-dominant immunity in mice. **Immunology Letters**, v. 62, n. 1, p. 39-43, 1998.

INAGAKI-OHARA, K. ; NISHIMURA, H.; MITANI, A.; YOSHIKAI,Y. Interleukin-15 preferentially promotes the growth of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing gamma delta T cell receptor in mice. **Eur. J. Immunol.**, v. 27, pp. 2885–2891, 1997

JAIN, N. C. **Essential of veterinary hematology**. Philadelphia: LEA & FEBIGER, 1993. p. 365-372.

JARILLO-LUNA, A, RIVERA-AGUILAR, V, MARTÌNEZ-CARRILLO, B. E.; BARBOSA-CABRERA, E.; GARFIAS, H. R.; CAMPOS-RODRÍGUEZ, R. Effect of restraint stress on the population of intestinal intraepithelial lymphocytes in mice. **Brain Behavior Immunity**, v. 22, p. 265-275, 2008.

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

KANITZ, E.; TUCHSCHERER, M.; PUPPE, B.; TUCHSCHERER, A.; STABENOW, B. Consequences of repeated early isolation in domestic pigles (*Sus scrofa*) on their behavioral, neuroendocrine, and immunological responses. **Brain, Bahavior, and Immunity**. v.18, p. 35-45, 2004.

KANNAN, G.; HEATH, J. L.; WABECK, C. J.; OWENS, S. L.; MENCH, J. A. Elevated Plasma corticosterone Concentrations Influence the Onset of Rigor Mortis and Meat Color in Broilers. **Poultry Science**, v. 77, p. 322-328.

KERHAVARZ, K.; FULLER, H. L. The influence of widely fluctuating temperatures on heat production and energetic efficiency of broilers. **Poultry Science**, v. 59, p. 2121-2128, 1980.

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,** v. 44, n. 3, p. 490-497, 2003.

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, p. 253-257, 2006.

KIANK, C.; DAESCHLEIN, G.; SCHUETT, C. Pneumonia as a long-term consequence of chronic psychological stress in BALB/c mice.**Brain. Behavior and Immunity**. 2008 *in press*

KIECOLT-GLASER, J. K.; MARUCHA, P. T.; ATKINSON, C.; GLASER, R. Hypnosis as a modulator of cellular immune dysregulation during acute stress. **Journal of consulting and clinical psychology**, v.69, n. 4, p.674-82, 2001.

KIRUNDA, D. F.; SCHEIDELER, S. E.; MCKEE, S. R. The efficacy of vitamin E (DL-alpha-tocopheryl acetate) supplementation in hen diets to alleviate egg quality deterioration associated with high temperature exposure. **Poultry Science**, v. 80, p. 1378-1383, 2001.

KLASING, K. C. Nutrition and the immune system. **British Poultry Science**, v. 48, n. 5, p. 525-537, 2007.
KORVER, D.R. Overview of the immune dynamics of the digestive system. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 15, n. 1, p. 123-135, 2006.

KUSHIMA, K.; FUJITA, M.; SHIGETA, A.; HORIUCHI, H.; MATSUDA, H.; FURUSAWA, S. Flow cytometric analysis of chicken NK activity and its use on the effect of restraint stress. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 65, n. 9, p. 995-1000, 2003.

KUSNECOV, A. V.; GROTA, L. J.; SCHMIDT, S. G.; BONNEAU, R. H.; SHERIDAN, J. F.; GLASER, R.; MOYHIHAN, J. A. Decreased herpes simplex viral immunity and enhanced

pathogenesis following stressor administration in mice. **Journal of Neuroimmunology**, v. 1, p. 129-137, 1992.

KUWAHARA, M. D.; SPARBER, S. B. Behaviral consequences of embryonic or early postnatal expousure to 1-α-noracetylmethadol (NLAAM) in the domestic chicken. **Neurobehavioral Toxicology and Teratology,** v. 4, p. 323-329, 1982.

LAWRENCE, D. A.; KIM, D. Central/peripheral nervous system and immune responses. **Toxicology**, v. 142, p. 189-201, 2000.

LIGEIRO DE OLIVEIRA, A. P; LAZZARINI, R.; CAVRIANI, G.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.; TAVARES DE LIMA, W.; PALERMO-NETO, J. Effects of single or repeated amphetamine treatment and withdrawal on lung allergic inflammation in rats. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 9, p. 1164-1171, 2008

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, p. 181-90. 2004

LIN, H.; DECUYPERE, E.; BUYSE, J. Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 144, n. 1, p. 11-17, 2006.

LIN, H.; SUI, S. J.; JIAO, H. C.; BUYSE, J.; DECUYPERE, E. Impaired development of broiler chickens by stress mimicked by corticosterone exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**, v. 143, p. 400-405, 2006.

LIN, H.; WANG, L. F.; SONG, J. L.; XIE, Y. M.; YANG, Q. M. Effect of dietary supplemental levels of vitamin A on the egg production and immune responses of heat-stressed laying hens. **Poultry Science**, v. 81, p. 458-465, 2002.

LIN, H; MERTENS, K.; KEMPS, B.; GOVAERTS, T.; DE KETELAERE, B.; DE BAERDEMAEKER, J.; DECUYPERE, E.; BUYSE, J. New approach of testing the effect of heat stress on eggshell quality: mechanical and material properties of eggshell and membrane. **British Poultry Science**, v. 45, p. 476-482. 2004.

Livro Branco sobre a Segurança dos Alimentos. Comissão das Comunidades Européias. União Européia: Documentos oficiais, **Livro Branco**. 2001. 62 p. [on-line, 16 de outubro de 2008]. Acesso: HTTP://www.europa.eu.int/comm/off/white/index_pt.htm.

MACARI, M. O frango adensado. **Globo Rural,** v. 13, n. 150, p. 48-54, 1998.

MACARI, M.; GONZALES, E. Fisiopatogenia da síndrome da morte súbita em frangos de corte. In**:** CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1990, Campinas. **Anais...** p. 65-73.

MACARI, M.; MALHEIROS, R. D.; FURLAN, R. L. Aspectos anatômicos e fisiológicos das aves de interesse econômico. In: PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, H. S.; GORNIAK, S. L. (Ed.). **Farmacologia Aplicada a Avicultura.** 1. ed. São Paulo: Editora Roca, 2005, p. 11-36.

MARCOS, A.; NOVA, E.; MONTERO, A. Changes in the immune system are conditioned by nutrition. **European journal of clinical nutrition**, v. 57, p. 66-69, 2003. Supplement 1.

MARTINDALE, R. G. Contemporary strategies for the prevention of stress-related mucosal bleeding. **Am.J.Health Syst. Pharm**., v. 62, p. 511-517, 2005.

MASHALY, M. M.; HENDRICKS, G, L.; KALAMA, M, A.; GEHAD, A, E.; ABBAS, A. O.; PATTERSO, P. H. Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. **Poultry Science.,** v.83, p. 889-94, 2004.

MASHALY, M. M.; TROUT, J. M.; HENDRICKS, G. III; 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, p. 409-422. 1998.

MCEWEN, B. S. Stressed or stressed out: what is the difference? **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v. 30, n. 5, p. 315-318, 2005.

MCEWEN, B. S. Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology. **Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 108-124, 2000.

MCEWEN, B. S. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. **Annais of New York Academy of Science**, v. 840, p. 33-44, 1998.

MCEWEN, B. S.; BIRON, C. A.; BUNSON, K. W.; BULLOCH, K.; CHAMBERS, W. H.; DHABHAR, F. S.; GOLDFARB, R.H.; MILLER, A.H.; SPENCER, R.L.; WEISS, J. M. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural and immune interactions. **Brain Research Review**., v. 23, n. 1-2, p. 79-133, 1997.

MCEWEN, B.S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Research**. v. 886, p. 172-189, 2000.

McKEE, J. S.; HARRISON, P. C.; RISKOWSKI. Effects of supplemental ascorbic acid om the energy conversation of broiler chicks during heat stress and feed withdrawal. **Poultry. Science,** v. 76, p. 1278-1286, 1997.

MILLER, A. H. Neuroendocrine and immune system interactions in stress and depression. **Psychiatr Clin North Am.,** v. 21, n. 2, p. 443-463, 1998.

MOBERG, G. P. Biological Response to Stress: implications for animal welfare. In: MOBERG, G. P.; MENCH, J. A. (Eds.). **The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare**, CABI Publishers, 2000, p. 1-22.

MOBERG, G. P. Suffering from stress: an approach for evaluating the welfare of an animal. In: Sandoe P. and Hurnik, T. (Ed.) **Proceedings of Welfare of Domestic Animals Concepts, Theories and Methods of Measurement**. Acta Agriculturae Sacandinavica, Sect. A, Animal Science. v. 27, p. 46-49. 1996.

MORGULIS, M. S.; RODRIGUES, P. M.; PALERMO-NETO, J. Benzodiazepine receptors and avian macrophage activity: diazepam decreases spreading and phagocytosis. **Immunopharmacolology Immunotoxicology**, v. 21, n. 4, p. 787-802, 1999.

MOURA, V.; PALERMO-NETO, J. **Effects of acute and long term carbamazepine administration in experimentals models of inflammation/immunity**. São Paulo, 2001. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MÜLLER, P.B. **Bioclimatologia aplicada aos animais domésticos**. Porto Alegre: Sulina, 1982. 158 p.

MUJAHID, A.; AKIBA, Y.; TOYOMIZU, M. Acute heat stress induces oxidative stress and decreases adaptation in young white leghorn cockerels by downregulation of avian uncoupling protein. **Poultry Science**, v. 86, p. 364-71, 2007.

NAAS, I. A.; LIMA, A. M. C.; BARACHO, M. S.; MIRAGLIOTA, M. Y. Ambiência e bem-estar. In: MENDES, A. A.; NAAS, I. A.; MACARI, M. (Ed.). **Produção de frangos de corte**. 1. ed. Campinas: FACTA, 2004, p. 37-54.

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

PALERMO NETO, J.; MASSOCO, C. O.; FAVARE, R. C. Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Neurotoxicology and teratology**, v. 23, n. 5, p. 497-507, 2001.

PALERMO-NETO, J., DE OLIVEIRA MASSOCO, C., ROBESPIERRE DE SOUZA, W. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain, Behavior and Immunity,** v. 17, n. 1, p. 43-54, 2003.

PALERMO-NETO, J.; FONSECA, E. S.; 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, v. 3, p. 435-440, 2008.

PALERMO-NETO, J.; GUIMARÃES, R. Pavlovian conditioning of a lung anaphilatic response. **Life Science**, v. 68, p. 611–623, 2000.

PAVLIDIS, N. P.; CHIRIGOS, M. Stress induced impairment of macrophage tumoricidal function. **Psychosomatic medicine**, v. 42, p. 47–54, 1980.

PORTELA, C. P.; MASSOCO, C. O.; LIMA, W. T.; PALERMO-NETO, J. Stress-induced increment on total bronchoalveolar cell count in OVA-sensitized rats. **Physiology & behavior**, v. 72, p. 415–420, 2001.

POST, J.; REBEL, J. M., TER HUURNE, A. A. Physiological effects of elevated plasma corticosterone concentrations in broiler chickens. An alternative means by which to assess the physiological effects of stress. **Poultry Science**, v. 82, n. 8, p. 1313-1318, 2003.

PURCHASE, H. G. Practical application of nucleic acid techniques to avian disease problems. **Avian diseases,** v. 33, n. 4, p. 609-614, 1989.

QURESHI, M. A.; DIETERT, R. R.; BACON, L. D. Genetic variation in the recruitment and activation of chicken peritoneal marophages. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 181, p. 560–568, 1986.

RABINOVITCH, M.; DE STEFANO, M. J. Macrophage spreading in vitro: I Inducers of spreading. **Experimental Cell Research**, v. 77, p. 323–334, 1973.

REICHE, E. M.; NUNES, S. O.; MORIMOTO, H. K. Stress, depression, the immune system, and cancer. **The Lancet Oncology**, v. 5, p. 617-625, 2004.

RENAUDEAU, D.; QUINIOU, N.; NOBLET, J. Effects of exposure to high ambient temperature and dietary protein level on performance of multiparous lactating sows. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 5, p.1240-1249, 2001.

REUL, J. M.; LABEUR, M. S.; WIEGERS, G. J.; LINTHORST, A. C. Altered neuroimmunoendocrine communication during a condition of chronically increased brain corti-cotropin-releasing hormone drive. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 840, p. 444-445, 1998.

RIDDELL, C. Alimentary system. In: RIDDEL, C. (Ed.). **Avian Histopathology.** Kansas: Allen Press,. p. 47-56. 1987.

RIGHI, D. A.; PALERMO-NETO, J. Behavioral effects of type II pyrethroid cyhalothrin in rats **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 191, p. 167-176, 2003.

RIGHI, D. A.; PALERMO-NETO, J. Effects of type II pyrethroid cyhalothrin on peritoneal macrophage activity in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 212, p. 98-106, 2005.

ROSALES, A. G.; VILLEGAS, P.; LUKERT, P. D. Isolation, identification and pathogenicity of two field strains of infectious Bursal virus. **Avian Diseases**, v. 33, n. 1, p.35-41, 1989.

ROZENBOIM, I.; TAKO, E.; GAL-GARBER, O.; PROUDMAN, J. A.; UNI, Z. The effect of heat stress on ovarian function of laying hens. **Poultry Science,** v. 86, n. 8, p. 1760-1765, 2007.

SÁ, L. R. M. **Síndrome de emagrecimento progressivo dos calitriquídeos - processo de má absorção semelhante à doença celíaca humana – caracterização clínica, laboratorial e anatomopatológica**. São Paulo, 2004. 186p. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

SABET, T.; HSIA, W.; STANISZ, M. EL-DOMEIRI, A.; VAN ALTTEN, P. A simple method for obtaining peritoneal macrophages from chickens. **Journal of immunological methods**, v. 14, p. 103–110, 1977.

SAKAI, M.; FONSECA, E. S.; DAGLI, M. L.; PALERMO-NETO, J. Diazepam effects on Ehrlich tumor growth and macrophage activity in mice. **Life Science**, v. 78, n. 16, p. 1777-1783, 2006.

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, p. 108-115, 2006.

SCHROTT, L. M.; GETTY, M. E.; WACNIK, P. W.; SPARBER, S. B. Open-Feild and LPS-induced sickness behavior in young chickens: Effects of embriogenic cocaine and/or ritanserin. **Pharmacology Biochemistry and Behavior, v.** 61, n. 1, p. 9-17, 1998.

SCHWARZ, M. J.; CHIANG, S.; MULLER, N.; ACKNHEIL, M. T-helper-1 and T-helper-2 responses in psychiatric disorders. **Brain, Behavior and Immunity**, v.15, p. 340-370, 2001.

SCOOT, T. A.; BALNAVE, D. Comparison between concentrated complete diets and self-selection for feeding sexuallymaturing pullets at hot and cold temperatures. **British Poultry Science**, v. 37, p. 819-827, 1988.

SCOTT, L.V.; DINAN, T.G. Vassopressin and the regulation of hypotjalamic-pituitary-adrenal axis function: implications for the pathophysiology of depression. **Life Science**, v. 62, p. 1985-1998, 1998.

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, p. 679-688, 2003.

SEVI, A.; TAIBI, L.; ALBENZIO, M.; MUSCIO, A.; DELL'AQUILA, S.; NAPOLITANO, F. Behavioral, adrenal, immune, and productive response of lactation ewes to regrouping and relocation. **Journal of Animal Science,** v. 79, p. 1457-1465, 2001.

SEYLE, H. A syndrome produced by diverse noxious agents. **Nature,** v. 122, p. 625-631, 1955.

SHEPHARD, R. J. Immune changes induced by exercise in an adverse environment. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 76, p. 539-546. 1998.

SHINI, S.; KAISER, P.; SHINI, A.; BRYDEN, W. L. Biological response of chickens (Gallus gallus domesticus) induced by corticosterone and a bacterial endotoxin. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, 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, p. 83-93, 2008.

SIEGEL, H. S. Effects of behavioural and physical stressors on immune response. In: WIEPKEMA, P. R.; VANANDRICHEM, P. W. M. (Ed.). **Biology of Stress in Farm Animals**. Dordrecht: MartinusNijhoff, 1987, p. 39–54.

SIEGEL, H. S.; VAN KAMPEN, M. Energy relationships in growing chickens given daily injections of corticosterone. **British Poultry Science**, v. 25, p. 477–485, 1984.
SIFRI, M. Informal Nutrition Symposium: Dynamics of the digestive system– Introduction. **Journal of Applied Poultry Research**, v.15, p. 122, 2006.

SIFRI, M.Informal nutrition symposium: dynamics of the digestive system – Introduction. Journal of Applied Poultry Research, v. 15, p. 122, 2006.

SILVA, F. R.; PALERMO-NETO, J. Development neuro and immunotoxic effects of prenatal diazepam treatment in rats**. Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 21, p. 247-265, 1999.

SOBRIAN, S. K.; VAUGHN, V. T.; ASHE, W. K.; MARKOVIC, B.; DJURIC, V.; JANKOVIC, B. D. Gestacional exposure to loud noise alters the development and postnatal responsiveness of humoral and cellular components of the immune system in offspring. **Environmental Research**, v. 73, p. 227-241, 1997.

SOLOMON, G. F. Stress and atibody respomse in rats. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v. 35, p. 97-104, 1969

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

STANKEVICIUS, D.; RODRIGUES-COSTA, E. C.; CAMILO FLÓRIO, J.; PALERMO-NETO, J. Neuroendocrine, behavioral and macrophage activity changes induced by picrotoxin effects in mice. **Neuropharmacology**, v. 54, p. 300-308. 2008.

TREMBICKI, K. A.; QURESHI, M. A.; DIETERT, R. R. Avian peritoneal exudate cells: A comparison of stimulation protocols. **Developmental and comparative immunology**, v. 8, p. 395–402, 1984.

TRISCHITTA, F.; DENARO, M. G.; FAGGIO, C. Effects of acetylcholine, serotonin and noradrenalin on ion transport in the middle and posterior part of Anguilla anguilla intestine. **Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology**, v. 169, p. 370-376, 1999.

TROUT, J. M.; MASHALY, M. M. Effects of *in vitro* corticosterone on chicken T- and B-lymphocyte proliferation. **British Poultry Science**, v. 36, p. 813– 820, 1995.

TROUT, J. M.; MASHALY, M. M. The effects of adrenocorticotropic hormone and heat stress on the distribution of lymphocyte populations in immature male chickens. **Poultry Science,** v. 73, p. 1694-1698, 1994.

TUR, J.; ESTEBAN, S.; RAYO, J. M.; MORENO, M.; MIRALLES, A.; TUR, J. A. Effect of glucocorticoids on gastrointestinal emptying in young broilers. **British Poultry Science**, v. 30, p. 693–698, 1989.

VAINIO, O.; IMHOF, B. A. The immunology and developmental biology of the chicken. **Immunology Today**, v. 6, n. 8, p. 365-370, 1995.

WATANABE, M.; UENO Y.; YAJIMA, T.; IWAO, Y.; TSUCHIYA, M.; ISHIKAWA ,H.; AISO S.; HIBI, T.; ISHII, H. Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes, **J. Clin. Invest**. **95** (1995), pp. 2945–2953.

WEBSTER MARKETON, J. I.; GLASER, R. Stress hormones and immune function. **Cell Immunology**, v. 252, p. 16-26, 2008.

WEIBEL, E. R.; GOMEZ, D. M. A principle for couting tissue structures on random sections. **Journal of applied physiology**, v. 17, p. 342- 348, 1962.

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

YAMAUCHI, K.; YAMAMOTO, K.; ISHIKI, Y. Morphological alterations of the intestinal villi and absorptive epithelial cells in each intestinal part in fasted chickens. **Japanese Poultry Science**, v. 32, p. 241–251, 1995.

YANG, V. E.; GLASER, R. Stress-induced immunomodulation and the implications for health. **International immunopharmacology,** v**.** 2, p. 315– 324, 2002.

ZULKIFLI, I.; ABDULLLAH, N.; AZRIN, N.M.; HO, Y.W. Growth performance and immune response of two commercial broiler strains fed diets containing Lactobacillus cultures and oxytetracycline under heat stress conditions. **British Poultry Science**. v. 41, p. 593-597, 2000.

APÊNDICE A

Tabela 26 – Avaliação histopatológica semiquantitativa do duodeno de frangos de corte submetidos ou não a estresse térmico de 26±1°C, 31±1°C ou 36±1°C, segundo relação vilo/cripta, comprimento de vilo, grau de hiperplasia da cripta, intensidade do processo inflamatório, infiltrados mononuclear, heterofilico, eosinofilico, numero de linfócitos intra-epiteliais em cada 100 enterócitos

CASO	V/C	VILO	CRIPTA	PI	MON	HET	EOS	LIE	Grupo
C1	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C2	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C3	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C4	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C5	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C6	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C7	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C8	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C9	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C10	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C11	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C12	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
E1	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E2	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E3	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E4	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E5	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E6	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E7	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E8	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E9	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E10	0	0	1	1	1	1	0	1	31±1°C
E11	0	0	1	1	1	1	0	1	31±1°C
E12	0	0	1	1	1	1	0	1	31±1°C
E13	0	0	1	0	0	0	0	1	31±1°C
E14	0	0	1	0	0	0	0	1	31±1°C
E15	1	1	1	0	0	0	0	1	31±1°C
E16	0	0	1	0	0	0	0	1	31±1°C
E17	0	0	1	0	0	0	0	1	31±1°C
E18	0	0	1	0	0	0	0	1	36±1°C
E19	0	0	1	0	0	0	0	1	36±1°C
E20	0	0	1	0	0	0	0	1	36±1°C
E21	0	0	1	0	0	0	0	1	36±1°C
E22	0	0	1	0	0	0	0	1	36±1°C
E23	0	0	1	0	0	0	0	1	36±1°C
E24	0	0	1	0	0	0	0	1	36±1°C
E25	0	0	1	0	0	0	0	1	36±1°C
E26	0	0	1	0	0	0	0	1	36±1°C

V/C = relação vilo/cripta; PI = processo inflamatório; MON = células mononucleares; HET = heterófilos; EOS = eosinófilos, LIE = número de linfócitos intraepitelias/100 enterócitos.

APÊNDICE B

Tabela 27 – Avaliação histopatológica semiquantitativa do jejuno de frangos de corte submetidos ou não a estresse térmico de 26±1°C, 31±1°C ou 36±1°C, segundo relação vilo/cripta, comprimento de vilo, grau de hiperplasia da cripta, intensidade do processo inflam inflamatório, infiltrados mononuclear, heterofilico, eosinofilico, numero de linfócitos intra-epiteliais em cada 100 enterócitos

CASO	V/C	VILO	CRIPTA	PI	MON	HET	EOS	LIE	Grupo
C1	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C2	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C3	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C4	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C5	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C6	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C7	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C8	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C9	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C10	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C11	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C12	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
E1	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E2	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E3	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E4	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E5	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E6	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E7	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E8	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E9	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E10	0	0	1	1	1	1	0	1	31±1°C
E11	0	0	1	1	1	1	0	1	31±1°C
E12	0	0	1	1	1	1	0	1	31±1°C
E13	0	0	1	1	1	0	0	1	31±1°C
E14	0	0	1	1	0	1	0	1	31±1°C
E15	0	0	1	0	0	0	0	1	31±1°C
E16	0	0	1	0	0	0	0	1	31±1°C
E17	0	0	1	0	0	0	0	1	31±1°C
E18	1	1	1	1	1	1	0	2	36±1°C
E19	1	1	1	1	1	1	0	1	36±1°C
E20	1	1	1	1	1	0	0	1	36±1°C
E21	0	0	1	1	1	0	0	1	36±1°C
E22	0	0	1	2	2	2	0	2	36±1°C
E23	0	0	1	0	0	0	0	1	36±1°C
E24	0	0	1	0	0	0	0	1	36±1°C
E25	0	0	1	0	0	0	0	1	36±1°C
E26	0	0	1	0	0	0	0	1	36±1°C

V/C = relação vilo/cripta; PI = processo inflamatório; MON = células mononucleares; HET = heterófilos; EOS = eosinófilos, LIE = número de linfócitos intraepitelias/100 enterócitos.

APÊNDICE C

Tabela 28 – Avaliação histopatológica semiquantitativa do ileo de frangos de corte submetidos ou não a estresse térmico de 26±1°C, 31±1°C ou 36±1°C, segundo relação vilo/cripta, comprimento de vilo, grau de hiperplasia da cripta, intensidade do processo inflamatório, infiltrados mononuclear, heterofilico, eosinofilico, numero de linfócitos intra-epiteliais em cada 100 enterócitos

CASO	V/C	VILO	CRIPTA	PI	MON	HET	EOS	LIE	Grupo
C1	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C2	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C3	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C4	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C5	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C6	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C7	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C8	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C9	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C10	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C11	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
C12	0	0	1	0	0	0	0	1	Controle
E1	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E2	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E3	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E4	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E5	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E6	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E7	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E8	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E9	0	0	1	0	0	0	0	1	26±1°C
E10	0	0	1	0	0	1	0	1	31±1°C
E11	0	0	1	0	0	0	0	1	31±1°C
E12	0	0	1	0	0	0	0	1	31±1°C
E13	0	0	1	0	0	0	0	1	31±1°C
E14	0	0	1	0	0	0	0	1	31±1°C
E15	0	0	1	0	0	0	0	1	31±1°C
E16	0	0	1	0	0	0	0	1	31±1°C
E17	0	0	1	0	0	0	0	0	31±1°C
E18	1	1	1	1	1	1	0	1	36±1°C
E19	1	1	1	1	1	0	0	1	36±1°C
E20	0	0	1	1	1	0	0	1	36±1°C
E21	0	0	1	0	0	0	0	1	36±1°C
E22	0	0	1	0	0	0	0	1	36±1°C
E23	0	0	1	0	0	0	0	1	36±1°C
E24	0	0	1	0	0	0	0	1	36±1°C
E25	0	0	1	0	0	0	0	1	36±1°C
E26	0	0	1	0	0	0	0	1	36±1°C

V/C = relação vilo/cripta; PI = processo inflamatório; MON = células mononucleares; HET = heterófilos; EOS = eosinófilos, LIE = número de linfócitos intraepitelias/100 enterócitos.

APÊNDICE D

Tabela 29 – Avaliação da fenotipagem de macrófagos peritoneais (KUL-01) colhidos de frangos de corte com 42 dias de vida, submetidos ou não a estresse térmico por calor (26±1ºC, 31±1ºC e 36±1ºC) do 35º ao 41º dia de vida

Parâmetro	**C_M**	**E_3 (26±1ºC)**	**E_2 (31±1ºC)**	**E_1 (36±1ºC)**
Fenotipagem (KUL-01)	93,13±6,33	93,01±5,56	91,34±7,39	92,93±5,32

Os dados representam a média ± desvio padrão de N=10 animais/grupo. p>0,05. Análise de variância ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer. Valores expressos em % de fluorescência.