WANDERLEY MORENO QUINTEIRO FILHO

Efeitos do estresse por calor sobre a imunidade e a migração de Salmonela enteritidis em frangos de corte

São Paulo
2013

WANDERLEY MORENO QUINTEIRO FILHO

Efeitos do estresse por calor sobre a imunidade e a migração de *Salmonela enteritidis* em frangos de corte

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. João Palermo-Neto

São Paulo
2013

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2756 Quinteiro Filho, Wanderley Moreno
FMVZ Efeitos do estresse por calor sobre a imunidade e a migração de *Salmonela enteritidis* em frangos de corte / Wanderley Moreno Quinteiro Filho. -- 2013.
168 f. : il.

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

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. João Palermo-Neto.

1. Estresse por calor. 2. INF-γ. 3. Citocinas. 4. Macrófagos. 5. Corticosterona. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos do estresse por calor (31+ ou - 1ºC) sobre expressão de hsp70, a imunidade e integridade da mucosa intestinal e sua relação com a migração de *Salmonela enteritidis* para órgãos linfóides, fígado e pulmão de frangos de corte", protocolado sob o nº1776/2009, utilizando 360 (trezentos e sessenta) galinhas, 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 14/10/09.

We certify that the Research "Effects of 31+ou-1ºC heat stressor on hsp70 expression, immunity and integrity of intestinal mucosa and the relationship between *Salmonella enteritidis* proliferation and migration to lymphoid organs, liver and lug of broilers", utilizing 360 (three hundred sixty) dogs, protocol number 1776/2009, 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 Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/14/09.

São Paulo, 16 de outubro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
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
05508-270

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: WANDERLEY MORENO QUINTEIRO FILHO

Titulo: Efeitos do estresse por calor sobre a imunidade e a migração de *Salmonela enteritidis* em frangos de corte

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____Julgamento:_____

Ao Prof. Dr. João Palermo Neto, um exemplo de profissional e pessoa. Durante essa longa jornada que inclui a IC, o Mestrado e, agora, o Doutorado foram mais de 9 anos de muitos ensinamentos. A constante busca pelo conhecimento e pelo aprendizado fazem do Prof. João um cientista e um professor de muito respeito e credibilidade. Um exemplo a ser seguido. Seus ensinamentos perdurarão por toda minha vida profissional, por esse motivo dedico esta obra a você, que me orientou, me fez entender, aprender e fazer ciência.

Muito Obrigado!

À Karen Fanti, minha companheira de hoje e sempre.

Sem você, nada disso seria possível.

Obrigado pela paciência e apoio incondicional.

Palavras não são sufientes para descrever o quanto você é importante para mim.

TE AMO

"O verdadeiro amor nunca se desgasta. Quanto mais se dá mais se tem"

Antoine de Saint-Exupéry

Às minhas irmãs, Wanice e Gabi. Obrigado pelo apoio, carinho e compreensão. Obrigado por sempre estarem dispostas a ajudar!

E, finalmente, dedico esta tese aos meus pais, Eunice e Wanderley, que me viram crescer, guiaram-me e educaram-me. Acreditaram nessa longa jornada. Não me questionaram. Apoiaram-me. Doaram-se por inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudéssemos realizar os nossos. Obrigado por ensinarem o que é caráter e respeito.

Amo vocês!!!

"A dúvida é o principio da sabedoria"

Aristóteles

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Projeto Tematico - nº 2009/51886-3; Bolsas - n° 2009/52487-5 e n° 2011/23391-0) e ao CNPq (Projeto Universal - nº 470776/2009-9) pelo suporte financeiro, que permitiu a execução deste estudo.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Patologia, pela formação e estruturas.

Ao Prof. João Palermo Neto por acreditar em mim e por 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 LABOR a todo o grupo de Neuroimunomodulação.

Ao Prof. Dr. Shayan Sharif, que gentilmente me aceitou em seu Laboratorio (Laboratory of Immunology/OVC-University of Guelph) e proporciou uma grande experiência no Canada. Aproveito para agradecer toda sua equipe, sempre muito atenciosos e pacientes.

À Dra. Claudete Astolfi-Ferreira pelo apoio nas metodologias microbiológicas desta tese e de inúmeros outros trabalhos.

À Profa. Dra. Cris Massoco pelas discussões e conversas. Sempre muito gentil, fez o final do doutorado ser mais tranquilo.

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

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

Às secretarias do VPT, em especial à Cris (Programa de Patologia Experimental e Comparada), por toda a ajuda em todas as etapas da pós-graduação.

Aos técnicos do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do VPT: das antigas, Priscila, Ricardo, Magali e os atuais, Dra. Nicolle, Vagner e Herculano pelo auxilio na realização dos experimentos.

Aos técnicos do Laboratório de Histopatologia, Luciano (Buga) e Claúdio, pelo auxilio no processamento e preparo das laminas histopatológicas.

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 à Helena, Elza e Neusa, sempre dispostas a ajudar.

Aos funcionários da Manutenção, em especial o Cabelo, Damião e Suli, parceiros em solucionar os problemas técnicos das nossas instalações.

A equipe do Laboratório de Ornitopatologia pela convivência harmôniosa.

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

Ao Rodrigo por estar sempre presente e disposto a nos auxiliar com os processos burocráticos e, principalmente, por toda a amizade construída nesses anos.

Dr. Thiago Aloia e ao Atilio pela ajuda nas técnicas de biologia molecualr e imunohistoquímica.

Aos amigos e colaboradores desta tese: Atilio, Andre Gomes, Bruno Honda, Tieme, Dra. Milena, Dra. Viviane, Dr. Alison e.Dr. Thiago

Ao meu primo Dr. Fabio Ribeiro da Silva, sempre atencioso e disposto a ajudar.

A toda minha Família, tios, avós, primos, sogros, cunhados e, em especial aos meus pais e irmãs. Muito Obrigado por me ajudarem a realizar esse sonho.

Ao Meu Avô Gabriel Silva (*in memory*). Realmente muito obrigado!

As figuras ilustres da pós-graduação do VPT: Adriana, Aline, Bruno, Camila, Carol Costola, Daniel Sanches, Daniel, Denise, Domenica, Dudu, Eduardo, Emily, Fernando, Gabi, Glaucie, João Gimenes,Luciana Allegretti, Luciana Cunha, Martinha, Monica, Poliana, Renato Moraes, Samantha, Tereza, Thaisa, Thalita, Thiago Marinho,Vinicius entre outros. Muito Obrigado!

RESUMO

QUINTEIRO-FILHO, W. M. **Efeitos do estresse por calor sobre a imunidade e a migração de *Salmonela enteritidis* em frangos de corte**. [Effects of heat stress on immunity and *Salmonella enteritidis* invasion in broiler chickens]. 2013. 168 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O estresse é uma realidade na produção avícola mundial. Sabe-se que ambientes estressores prejudicam o bem-estar, os parâmetros produtivos e a imunidade de frangos de corte. Sabe-se, também, que o estresse por calor diminui a atividade de macrófagos em frangos de corte e, que existem, inúmeros estressores ambientais que insidem sobre a produção animal e podem aumentar a susceptibilidade às doenças. A *Salmonella spp.* é uma das maiores zoonoses do mundo, causando mais de 1 bilhão de casos de infecção. Nesse sentido, o presente trabalho analisa os efeitos do estresse por calor (31±1°C) sobre os índices zootécnicos, a imunidade, a invasão bacteriana e a integridade intestinal em frangos de corte infectados com *Salmonella enteritidis*; os dados obtidos foram discutidos dentro de uma perspectiva neuroimune. Os frangos foram divididos em quatro grupos: 1) Controle (C); 2) Estresse por Calor a 31±1 °C (HS31°C); 3) Controle infectados com *Salmonella enteritidis* (Controle Positivo [PC]) e; 4) Estresse por calor a 31±1 °C e infectados com *Salmonella* (PHS31°C). Nossos resultados mostraram que o estresse por calor em uma situação de infecção experimental por *Salmonella enteritidis* (grupo PHS31°C) 1) diminuiu os índices zootécnicos; especificamente, diminuiu o ganho de peso, consumo de alimento e a conversão alimentar; 2) diminuiu os níveis plasmáticos de INF-γ e IgA; 3) diminuiu a expressão de, IL-6 e IL-12 em baço e diminui IL1-β, IL-10 e TGF-β em tonsila cecal; 4) diminuiu a expressão de AvBD-4 e AvBD-6 em tonsila cecal e; 5) diminuiu a expressão de TLR-2 em baço e tonsila cecal. Observamos, também, 6) aumento dos níveis séricos de corticosterona nos animais dos grupos HS31°C e PHS31°C e; 7) piora no quadro de enterite produzida pela *Salmonella enteritidis*, quando os animais foram estressados por calor, caracterizando-se uma enterite moderada ao longo de todo o intestino delgado. Finalmente, 8) observamos que o estresse por calor aumentou a migração de *Salmonella enteritidis* para baço das aves do grupo PHS31°C, porém esse aumento não foi observado no fígado; observamos, também, presença de *Salmonella* na medula osssea dos animais estressados e infectado com essa bactéria. Os dados obtidos sugerem que a somatória dos fatores estresse por calor e infecção por *Samonella* prejudicou os parâmetros produtivos, a integridade intestinal, a imunidade e, em especial a ativação e atividade de macrófagos, possibilitando um aumento da migração de *Salmonella enteritidis* para o baço e medula óssea

dos frangos de corte. Neste sentido, o estresse por calor teria prejudicado a qualidade da barreira imune intestinal, via ativação do eixo HPA e aumento dos níveis de corticosterona, diminuindo a imunidade inata proporcionando a migração das bactérias patogênicas através da mucosa intestinal para o baço e a medula óssea das aves estressadas.

Palavras-chave: Estresse por calor. INF-γ. Citocinas. Macrófagos. Corticosterona.

ABSTRACT

QUINTEIRO-FILHO, W. M. **Effects of heat stress on immunity and *Salmonella enteritidis* invasion in broiler chickens.** [Efeitos do estresse por calor sobre a imunidade e a invasão de *Salmonela enteritidis* em frangos de corte.]. 2013. 168 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Stress is a reality in the world poultry production. Environmental stressors impair both welfare, performance parameters and immunity in broiler chickens. Heat stress decreases macrophage activity in broiler chickens and many environmental stressors that impact animal production increases animal's susceptibility to diseases. *Samonella* spp is one of the most endemic zoonotic diseases of the world, inducing more than 1 billion infection cases per year. In this way, we studied the effects of 31±1°C heat stress on performance parameters, immunity, bacteria invasion and intestinal integrity in broiler chickens experimentally infected with *Salmonella enteritidis*; the data were discussed under a neuroimmune perspective. The broiler chickens were divided into four different groups: 1) Control group (C); 2) 31±1 °C heat stressed group (HS31°C); 3) Control group infected with *Salmonella enteritidis* – Positive control (PC) and; 4) 31±1 °C heat stressed and *Salmonella enteritidis* infected group (PHS31°C). We showed the heat stress applied in the course of *Salmonella enteritidis* infection (PHS31°C group) decreased poultry performance parameters; specifically, it decreased the body weight gain, the feed intake and the food conversion; 2) decresead INF-γ and IgA plasmatic levels; 3) decreased the mRNA expression of IL-6 and IL-12 in spleen and the mRNA expression of IL1-β, IL-10 and TGF-β in cecal tonsil; 4) decreased the mRNA expression of AvBD-4 and AvBD-6 in cecal tonsil and; 5) decreased the mRNA expression of TLR-2 in spleen and cecal tonsil. We also observed 6) an increase in corticosterone serum levels in the animals of the HS31°C and the PHS31°C groups and, 7) more severe intestinal inflamation produced by *Salmonella enteritidis* in heat stressed chickens, characterized by a moderate enteritis throughout all the small intestine mucosa (PHS31°C group). Finally, 8) we showed that the heat stress increased splenic *Salmonella enteritides* invasion in PHS31°C broiler chickens; we also observed the presence of *Salmonella* in the bone marrow of stressed and infected broiler chickens. These data suggest that heat stress and *Salmonella* infection working together impair chicken's performance parameters, intestinal integrity and immunity (specially the macrophage activity), increasing ate the same time splenic and bone marrow Sal*monella enteritidis* invasion. Thus, heat stress could have impared the intestinal immunity barrier quality, via HPA axis activation and corticosterone serum levels release, decreasing the inate immunity and, providing pathogenic

bacteria migration through the intestinal mucosa for spleen and bone marrow of the heat stressed chickens.

Key-words: Heat stress. INF-γ. Cytokines. Macrophage. Corticosterone.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de *primers* de citocinas e AvBD que foram utilizadas nas reações de PCR em tempo real. 56

Tabela 2 – Sequência de *primers* que foram utilizadas nas reações de PCR tempo real. 57

Tabela 3 – Efeitos do estresse por calor (31±1°C) sobre os índices zootécnicos de frangos de corte infectados com *Samonella enteritidis* 62

Tabela 4 – Efeitos do estresse por calor sobre os níveis séricos de corticosterona em frangos de corte infectados ou não por *Salmonella enteritidis* 65

Tabela 5 – Efeitos do estresse por calor (31±1°C) sobre a colonização e invasão bacteriana em frangos de corte infectados ou não com *Samonella enteritidis* 66

Tabela 6 – Efeitos do estresse por calor sobre os níveis plasmáticos de IgA de frangos de corte infectados ou não por *Salmonella enteritidis* 69

Tabela 7 – Efeitos do estresse por calor sobre os níveis plasmáticos de INF-γ de frangos de corte infectados ou não por *Salmonella enteritidis* 71

Tabela 8 – Efeitos do estresse crônico por calor de 31±1ºC sobre a colonização e a migração de *Salmonella enteritidis* para papo, ceco, fígado, baço e medula óssea em frangos de corte 72

Tabela 9 – Efeitos do estresse por calor sobre a expressão de citocinas em baço de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis* 83

Tabela 10 – Efeitos do estresse por calor sobre a expressão de citocinas em tonsila cecal de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis* 84

Tabela 11 – Efeitos do estresse por calor sobre a expressão de AvBD-1, AvBD-2, AvBD-4 e AvBD-6 em baço de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis* 89

Tabela 12 – Tabela X: Efeitos do estresse por calor sobre a expressão de AvBD-1, AvBD-2, AvBD-4 e AvBD-6 em tonsila cecal de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis* 90

Tabela 13 – Efeitos do estresse por calor sobre a expressão gênica de TLR-2, TLR-4 e *MyD88* em baço de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis* 92

Tabela 14 – Efeitos do estresse por calor sobre a expressão gênica de TLR-2, TLR-4 e MyD88 em tonsila cecal de frangos de corte infectados com *Salmonella enteritidis* 92

Tabela 15 – Efeitos do estresse por calor sobre a expressão gênica de *HSP70* em tonsila cecal de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis* 94

Tabela 16 – Avaliação histopatológica semiquantitativa do duodeno de frangos de corte submetidos ou não a estresse por calor (31±1°C) e infectados ou não por *Salmonella enteritidis* 136

Tabela 17 – Avaliação histopatológica semiquantitativa do jejuno de frangos de corte submetidos ou não a estresse por calor (31±1°C) e infectados ou não por *Salmonella enteritidis* 137

Tabela 18 – Avaliação histopatológica semiquantitativa do íleo de frangos de corte submetidos ou não a estresse por calor (31±1°C) e infectados ou não por *Salmonella enteritidis* 138

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura interna de uma das salas climatizadas usadas no bloco 1 de experimentos 47

Figura 2 – Estrutura interna de uma das salas climatizadas usadas no bloco 1 de experimentos 47

Figura 3 – Box com aves de 1 (um) dia de vida 47

Figura 4 – Isolador de Aves Alesco® 48

Figura 5 – Pintinhos de 1 dia alojados na Câmara Isoladora Alesco® 49

Figura 6 – Pintinhos de 1 dia alojados em Câmara Isoladora Alesco® 49

Figura 7– Inoculação experimental de *Salmonella Enteritidis* no primeiro dia de vida. Procedimento realizado em fluxo laminar 51

Figura 8 – Esquema do protocolo experimental utilizado no experimento 1 60

Figura 9 – Efeitos do estresse por calor sobre o ganho de peso de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis* 62

Figura 10 – Efeitos do estresse por calor sobre o consumo de ração de frangos de corte infectados ou não por *Salmonella enteritidis* 63

Figura 11 – Efeitos do estresse por calor sobre a conversão alimentar (CA) de frangos de corte infectados ou não por *Salmonella enteritidis* 63

Figura 12 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre os níveis séricos de corticosterona (pg/ml) em frangos de corte infectados com *Samonella enteritidis* 65

Figura 13 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a migração de *Salmonella enteritdis* para o baço de frangos de corte 67

Figura 14 – Esquema do protocolo experimental utilizado no experimento 3 68

Figura 15 – Efeitos do estresse por calor sobre os níveis plasmáticos de IgA de frangos de corte infectados ou não por Salmonella enteritidis 69

Figura 16 – Efeitos do estresse por calor sobre os níveis plasmáticos de IgG de frangos de corte infectados ou não por Salmonella enteritidis 70

Figura 17 – Efeitos do estresse por calor sobre os níveis plasmáticos de INF-γ de frangos de corte infectados ou não por Salmonella enteritidis 71

Figura 18 – Imunohistoquimica para detecção de *Salmonella* no ceco de frangos de corte estressados por calor e infectados 73

Figura 19 – Imunohistoquimica para detecção de *Salmonella* no baço de frangos de corte estressados por calor e infectados 73

Figura 20 – Imunohistoquimica para detecção de *Salmonella* no baço de frangos de corte estressados por calor e infectados. 74

Figura 21 – Imunohistoquimica para detecção de *Salmonella* no baço de frangos de corte estressados por calor e infectados 74

Figura 22 – Fotomicrografia do duodeno de frangos de corte com 42 dias de vida. A) Grupo Controle; B) Grupo HS31°C; C) Grupo PC; D) Grupo PHS31°C 76

Figura 23 – Fotomicrografia do jejuno de frangos de corte com 42 dias de vida. A) Grupo Controle; B) Grupo HS31°C; C) Grupo PC; D) Grupo PHS31°C 77

Figura 24 – Fotomicrografia do íleo de frangos de corte com 42 dias de vida. A) Grupo Controle; B) Grupo HS31°C; C) Grupo PC; D) Grupo PHS31°C 78

Figura 25 – Fotomicrografia do duodeno de frangos de corte com 42 dias de vida. A) Grupo Controle; B) Grupo HS31°C; C) Grupo PC; D) Grupo PHS31°C 79

Figura 26 – Fotomicrografia do jejuno de frangos de corte com 42 dias de vida. A) Grupo Controle; B) Grupo HS31°C; C) Grupo PC; D) Grupo PHS31°C 80

Figura 27 – Fotomicrografia do íleo de frangos de corte com 42 dias de vida. A) Grupo Controle; B) Grupo HS31°C; C) Grupo PC; D) Grupo PHS31°C 81

Figura 28 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a expressão gênica de IL1-β (expressão relativa de β-actina) em baço (A) e tonsila cecal (B) de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis* 84

Figura 29 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a expressão gênica de IL-6 (expressão relativa de β-actina) em baço (A) de frangos (B) de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis* 85

Figura 30 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a expressão gênica de IL-10 (expressão relativa de b-actina) em baço (A) e tonsila cecal (B) de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis* 85

Figura 31 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a expressão gênica de IL-12 (expressão relativa de β-actina) em baço (A) e tonsila cecal (B) de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis* 86

Figura 32 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a expressão gênica de TGF-b (expressão relativa de b-actina) em baço (A) e tonsila cecal (B) de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis* 86

Figura 33 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a expressão gênica de IL-8 (expressão relativa de b-actina) em baço (A) e tonsila cecal (B) de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis* 87

Figura 34 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C)sobre a expressão gênica de IL-13 (expressão relativa de b-actina) em baço (A) e tonsila cecal (B) de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis* 87

Figura 35 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a expressão gênica de IL-17 (expressão relativa de b-actina) em baço (A) e tonsila cecal (B) de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis* 88

Figura 36 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a expressão gênica de INF-γ (expressão relativa de b-actina) em baço (A) e tonsila cecal (B) de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis* 88

Figura 37 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a expressão gênica de AvBD-4 (expressão relativa de b-actina) em baço (A) e tonsila cecal (B) de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis* 90

Figura 38 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a expressão gênica de AvBD-6 (expressão relativa de b-actina) em baço (A) e tonsila cecal (B) de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis* 91

Figura 39 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a expressão gênica de TLR-2 (expressão relativa de β-actina) em baço (A) e tonsila cecal (B) de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis* 93

Figura 40 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a expressão gênica de TLR-4 (expressão relativa de b-actina) em baço (A) e tonsila cecal (B) de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis* 93

Figura 41 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a expressão gênica de *HSP70* (expressão relativa de b-actina) em baço (A) e tonsila cecal (B) de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis* 95

Figura 42 – Figura esquemática das hipóteses sugeridas para os efeitos do estresse por calor sobre a imunidade e migração de *Salmonella* 112

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH – Hormônio adenocorticoprópico

CRH – Hormônio Liberador de Corticotropina

HPA – Hipofise – pituitária – adrenal

Ig - Imunoglobulina

IL – Interleucina

LPS - Lipopolissacarídeo

NK – *natural killer*

SAPI – *Staphylococcus aureus*

SCF – *stem cell factor*

SI – Sistema Imunológico

SNA – Sistema Nervoso Autônomo

SNAP – Sistema nervoso autônomo parassimpático

SNAS – Sistema nervos autônomo simpático

SNE – Sistema Nervoso Entérico

SNC – Sistema Nervoso Central

TNF-α – fator de necrose tumora - α

ERO – Espécies reativas de oxigênio

SRBC – *Sheep Red Blood Cell*

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

HEPA – *High-Efficiency Particulate Air*

AvBD – *Avian β-defensin*

TLR – *Toll like receptors*

AVP – *arginine vasopressin*

Th1 – Linfócitos T helper 1

Th2 – Linfócitos T helper 1

NA – noradrenalina

6-OHDA – 6 hidroxidopamina

CFU – *colony formation unit*

MyD88 – *Myeloid differentiation primary response gene (88)*

iNOS – *inducible Nitric Oxide Synthases*

HSP – *heat shock protein*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 24
2 REVISÃO DE LITERATURA 27
2.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO 27
2.2 MACRÓFAGOS 34
2.3 ESTRESSE POR CALOR E SUAS CONSEQUÊNCIAS 39
3 OBJETIVOS 44
3.1 OBJETIVOS GERAIS 44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 44
4 MATERIAL E MÉTODOS 46
4.1 ANIMAIS 46
4.2 SALAS CLIMATIZADAS E ISOLADORES 46
4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS E ESTRESSE TÉRMICO 50
4.4 INFECÇÃO EXPERIMENTAL 50
4.5 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO PRODUTIVO DAS AVES 51
4.6 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA 52
4.7 ANÁLISE DA INTEGRIDADE DO TRATO GASTROINTESTINAL: EXAME ANATOMOPATOLÓGICO E MORFOMÉTRICO DO INTESTINO 52
4.8 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA 53
4.9 ANÁLISE DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE IGA E IGG 54
4.10 ANÁLISE DE CITOCINAS E DEFENSINAS AVIARIAS (AVBD) 55
4.11 ANÁLISE DE *HSP70*, TLR-2, TLR-4, *MYD88* 57
4.12 DETECÇÃO DE *SALMONELLA ENTERITIDES* POR IMUNOHISTOQUÍMICA 58
4.13 ANÁLISE DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE INF-Γ 58
4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA 59
5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS 60
5.1 EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES ZOOTÉCNICOS DE FRANGOS DE CORTES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *SALMONELLA ENTERITIDIS*, E SUBMETIDOS OU NÃO AO ESTRESSE TÉRMICO POR CALOR (31±1°C) 60
5.1.1 Resultados *61*
5.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA E DA MIGRAÇÃO BACTERIANA EM FRANGOS DE CORTES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *SALMONELLA ENTERITIDIS*, E SUBMETIDOS OU NÃO AO ESTRESSE TÉRMICO POR CALOR (31±1°C) 64
5.2.1 Resultados *64*

5.3 EXPERIMENTO 3: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE IGA, IGG, E INF-Γ, INTEGRIDADE INTESTINAL E DA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE ÓRGÃOS ALVOS DE FRANGOS DE CORTES INFECTADOS OU NÃO COM *SALMONELLA ENTERITIDIS*, E SUBMETIDOS OU NÃO AO ESTRESSE POR CALOR (31±1°C) 67

5.3.1 Resultados *68*

5.4 EXPERIMENTO 4: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS, B-DEFENSINAS AVIÁRIAS (AVBD), TLR-2, TLR-4, *MYD88* E *HSP70* EM FRANGOS DE CORTES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE COM *SALMONELLA ENTERITIDIS*, E SUBMETIDOS OU NÃO AO ESTRESSE TÉRMICO POR CALOR (31±1°C) 82

5.4.1 Resultados *82*

7 DISCUSSÃO 96

8 CONCLUSÕES 113

8.1 CONCLUSÕES ESPECIFICAS 113

8. 2 CONCLUSÃO GERAL 113

REFERÊNCIAS 115

APÊNDICES 135

APÊNDICE A 136

APÊNDICE B 137

APÊNDICE C 138

ANEXOS 139

ANEXO A 140

ANEXO B 150

ANEXO C 161

1 INTRODUÇÃO

Entre os anos de 1960 e 2012 a produção avícola mundial quadruplicou (FAO, 2012; UBABEF, 2012). Os índices de produtividade saltaram de 8 milhões de toneladas em 1960 para 71,715 milhões de toneladas em 2009 (FAO, 2012; UBABEF, 2012). O Brasil obteve um desenvolvimento expressivo na produção de frangos de corte ocupando, hoje, a posição de terceiro maior produtor de frangos (13,08 milhoes de toneladas em 2011) e o maior país exportador desta *commoditie* (valores que quadruplicaram desde 2000); exportamos para mais de 153 diferentes nações e somos os responsáveis por mais de 41% das exportações de carne de frango do mundo (UBABEF, 2012). A significativa quantidade produzida, aliada aos preços atrativos do mercado consumidor, tem levado o consumo nacional à marca de 47,4kg por habitante/ano, tornando-se assim a carne de frango aquela mais consumida pelo brasileiro (UBABEF, 2012). Entretanto, esta conquista não acorreu por acaso; foi decorrência direta do emprego de muita tecnologia e pesquisa. Significantes investimentos vêm sendo realizados nas áreas de seleção genética, nutrição, ambiência e bem-estar, controle de doenças, sanidade, transporte e processamento de carne avícola.

Considerando-se essa gigantesca escala de produção, não é de se estranhar que o meio ambiente e o bem-estar animal venham se tornando um foco de atenção por parte dos consumidores; em decorrência disso, novas tecnologias para mensurar e melhorar as condições de vida dos animais de produção têm sido procuradas e desenvolvidas. Nesse sentido, o estresse e suas implicações dentro da produção avícola tornaram-se importantes objetos de estudo. Uma série de fatores como o clima, o ambiente, o estado nutricional, fisiológico e social dos animais assim como outros fatores decorrentes de manejos inadequados podem gerar estresse nos animais de produção (BROOM; MOLENTO, 2004; LAY et al., 2011; BERNARDINO, 2004), acarretando problemas como queda no ganho de peso e aumento no consumo de ração, aumento de conversão alimentar e, entre outros, aumento da mortalidade em especial em frangos expostos a estressores de maneira prolongada ou crônica (ALBUQUERQUE et al., 2006; QUINTEIRO-FILHO et al., 2010).

Paralelamente a esses acontecimentos, os estudos sobre as interações bi-direcionais entre o Sistema Nervoso Central (SNC) e o Sistema Imune (SI) vêm crescendo de forma expressiva; pesquisas em neuroimunomodulação ou psiconeuroimunologia vêm ganhando

força e notoriedade na comunidade científica (BLALOCK; COSTA, 1989; BESEDOVSKY; DEL REY, 1996; LICINIO; FROST, 2000; PALERMO-NETO; DE OLIVEIRA MASSOCO; ROBESPIERRE DE SOUZA, 2003; COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010). 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, aumento dos níveis de corticosterona e comportamento doentio (JOHNSON, 1998; CONNOR et al., 2002; COHN; DE SA-ROCHA, 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 piretróides do tipo II, modificam a função imune (PALERMO NETO; MASSOCO; FAVARE, 2001b; PORTELA CDE et al., 2001; ESKANDARI; STERNBERG, 2002; RIGHI; PALERMO-NETO, 2005; GLAC et al., 2006; SAKAI et al., 2006; LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2008; PALERMO-NETO et al., 2008; QUINTEIRO-FILHO; RIGHI; PALERMO-NETO, 2009; RIGHI; XAVIER; PALERMO-NETO, 2009).

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. A União Européia estabeleceu normas de bem-estar animal que, agora, vêm sendo solicitadas e, até mesmo exigidas, por parcela significante de consumidores brasileiros; estas normas devem ser seguidas com cautela pelos países produtores e exportadores de produtos de origem animal. Dentre elas, destaca-se a necessidade de garantir aos animais ausência de estressores físicos ou ambientais durante a produção, um fato considerado cada vez mais importante para a moderna produção animal. Nesse contexto, um tipo de estressor ambiental relevante à avicultura é o estresse por calor. Além do desconforto físico, a alta temperatura ambiente causa transtornos para a produção de frangos. Relatou-se que o aumento de temperatura ambiente foi seguido por: diminuição do crescimento e do consumo de ração por parte desses animais, desajustes fisiológicos como, por exemplo, hormonais (aumento dos níveis séricos de corticosterona e de catecolaminas) e, ainda por aumento da suscetibilidade às doenças e/ou maior mortalidade (FRANCI et al., 1996; GERAERT; PADILHA; GUILLAUMIN, 1996; KHAJAVI et al., 2003; MUJAHID; AKIBA; TOYOMIZU, 2007; QUINTEIRO-FILHO et al., 2010).

Em nosso trabalho anterior, investigamos a relação existente entre o calor ambiente (31°C e 36°C) os índices zootécnicos, a imunidade inata e a integridade intestinal (QUINTEIRO-FILHO et al., 2010). Observamos que na vigência de estresse térmico por calor

mantido por 10h/dia durante 6 dias, as aves apresentavam diminuição do ganho de peso e do consumo de ração, aumento dos níveis de corticosterona sérica e diminuição da atividade de macrófagos peritoneais. Observamos, também, a presença de discreta enterite caracterizada por aumento de infiltrado inflamatório linfo-plasmocitario na lamina própria do jejuno dos animais submetidos ao estresse por calor. Acreditamos, dessa forma, 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, propiciando o aparecimento de processos inflamatórios intestinais (QUINTEIRO-FILHO et al., 2010).

O presente trabalho é continuação desta linha de pesquisa. Desta feita, além das variáveis anteriores, analisaremos, dentro de uma perspectiva neuroimune, as relações entre o estresse por calor (31±1°C), a atividade de macrófagos, a expressão de citocinas e a migração de *Salmonela enteritidis* (infecção experimental) da luz intestinal para baço, fígado e medula óssea.

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; LYTE; GAYKEMA, 2007). Embora de conhecimento amplo, foi somente nas últimas duas décadas que se começou a dar maior importância científica ao estudo destas interações neuroimunes bidirecionais, já que até então prevalecia uma tendência de setorizar as abordagens experimentais que se faziam quer no SNC quer no SI (BESEDOVSKY; REY, 2007; COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010).

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 entre o SNC e o SI. O termo inter-relações foi empregado porque se sabe, serem estas relações bidirecionais (COHEN; HERBERT, 1996; ALVES; PALERMO-NETO, 2007; COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010). Atualmente sabe-se que diversos estímulos provenientes do SNC, como estresse e alterações emocionais, são capazes de modular uma resposta imune. De fato, estressores físicos e psicológicos podem causar um déficit pronunciado na imunidade, em especial, no número de células esplênicas, na proliferação de linfócitos B, T, T *helper* e T citotóxico, na atividade e no número de células *natural killer* (NK) e na atividade de macrófagos e neutrófilos (FONSECA; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2002; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2003; PALERMO-NETO; DE OLIVEIRA MASSOCO; ROBESPIERRE DE SOUZA, 2003; ALVES et al., 2006; PALERMO-NETO et al., 2008). Ao alterar a resposta imune, estes estressores interferem com o desenvolvimento de neoplásias e de

infecções em animais (PALERMO NETO; MASSOCO; FAVARE, 2001b; PALERMO-NETO; DE OLIVEIRA MASSOCO; ROBESPIERRE DE SOUZA, 2003; SAKAI et al., 2006; PALERMO-NETO et al., 2008) e no ser humano (COHEN; POLLACK, 2005; ARMAIZ-PENA et al., 2012; DIMITRIJEVIC et al., 2012; TAVANO et al., 2012).

Grande parte da influência do SNC sobre o SI é exercida por dois mecanismos principais: 1) uma resposta hormonal ao estresse com a consequente produção de glicocorticóides via eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e, 2) uma Resposta pelo Sistema Nervoso Autônomo, como liberação de noradrenalina pelo Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNAS) e de adrenalina pela medula da adrenal (WEBSTER; TONELLI; STERNBERG, 2002; NANCE; SANDERS, 2007a; WEBSTER MARKETON; GLASER, 2008).

O hipotálamo apresenta diversas conexões neurais como o sistema límbico, que estão envolvidos nos processos de adaptação e nas respostas neuro-endocrinas e emocionais ao estresse. O hipotálamo recebe, assim, informações provenientes da periferia, integra-as com o ambiente interno, e promove o necessário ajuste de certas funções, como por exemplo, do funcionamento do Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNAS) e das secreções hormonais endócrinas, como, por exemplo, 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, sinérgicos e até mesmo antagônicos. A natureza dessas interações é exemplificada, como já comentado, pelas habilidades que detém o SNC de produzir neurotransmissores e neuropeptídeos que modificam diretamente a atividade de células imunes ou o fazem indiretamente através da ativação do eixo HPA e/ou do SNAS (GANEA, 1996; GARZA; CARR, 1997; REUL et al., 1998; ESKANDARI; STERNBERG, 2002; COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010; BESEDOVSKY; DEL REY, 2011; DIMITRIJEVIC et al., 2012).

O eixo HPA desempenha um papel central nas alterações fisiopatológicas e psicopatológicas resultantes da exposição a estressores e, por esta razão, é um dos sistemas melhor caracterizados desde o ponto de vista nervoso e endócrino (ARMARIO et al., 2012). O eixo HPA, como outros sistemas neuroendócrinos, tem vários níveis anatômicos que pressupõem a liberação de vários hormônios.

O principal “desencadeador” dos processos imunes regulados pelo eixo HPA é o Hormônio Liberador de Corticotropina (CRH). O CRH, junto com outros fatores

hipotalámicos como a vasopresina (arginina-vasopresina, AVP, na maioria dos mamíferos), alcança a adenohipófise onde estimula a síntese e a liberação de ACTH na circulação. Este, por sua vez, atua sobre as células da zona fasciculada do córtex da adrenal, estimulando a síntese e a secreção de glicocorticoides (SCOTT; DINAN, 1998; ARMARIO et al., 2012); 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). Sabe-se, que os níveis de CRH são positivamente regulados, entre outros, pelos sistemas serotominérgicos, colinérgicos e catecolaminérgicos centrais (CALOGERO et al., 1990; CALOGERO et al., 1996). 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).

Os glicocorticoides exercem muitas funções no organismo e estão implicados na maioria das consequências negativas associadas ao estresse. No entanto, níveis apropriados de glicocorticoides são importantes para a manutenção da homeostase. As funções exercidas pelos glicocorticoides podem ser divididas em duas categorias principais: as moduladoras e as reparatórias (SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000). As ações moduladoras são aquelas que alteram a resposta do organismo frente a um entressor e podem ser divididas em 3 categorias: permissivas, supressoras e estimuladoras. Pelas ações permissivas se compreende aquelas que facilitam a ação de outros sistemas que participam na fase inicial de resposta ao estresse. Essas ações requerem níveis mínimos de glicocorticoides prévios à situação e preparam mecanismos de defesa do organismo para enfrentar o estresse. Nesta categoria se inclui o efeito facilitador da resposta cardiovascular, que é determinada, sobretudo por outros fatores (ex: ativação simpática). As ações supressoras são uma consequência da liberação de glicocorticoides durante o estresse, tendo início após 1h ou mais da aplicação da situação estressante; têm o objetivo de prevenir as consequências negativas de uma resposta excessiva. Mediante estas ações, os glicocorticoides inibem o sistema imune, a resposta inflamatória e a atividade do próprio eixo HPA através de mecanismos de retroinibição. As ações estimuladoras, que também se iniciam 1h ou mais após a indução do estresse, têm como função potenciar os efeitos de outros hormônios liberados durante o estresse (ex: potenciação da lipólise e gliconeogênese) (SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000; ARMARIO et al., 2012).

Assim, por exemplo, estados como medo, ansiedade e depressão, que estão ligados a um aumento da atividade do eixo HPA, têm sido correlacionados a um déficit pronunciado de imunidade, em especial, do numero de células esplênicas, da proliferação de linfócitos B, linfócitos T *helper* e T citotóxico, da atividade e numero de células *natural killer* (NK) e da atividade de macrófagos (PALERMO NETO; MASSOCO; FAVARE, 2001b; PALERMO-NETO; DE OLIVEIRA MASSOCO; ROBESPIERRE DE SOUZA, 2003; SA-ROCHA; SA-ROCHA; PALERMO-NETO, 2006; COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010). Os glicocorticoides naturais e sintéticos inibem a proliferação de células T estimuladas por mitógenos e por aloantigenos *in vitro,* através da ligação com receptores de glicocorticoides citoplasmáticos presentes nessas células (MADDEN; FELTEN, 1995).

Neste sentido, os glicocorticóides induzem uma mudança do perfil de citocinas Th1 para um perfil de citocinas Th2. A imunidade Th1 (Imunidade Celular) é caracterizada pela expressão de citocinas pro-inflamatórias, tais como Interferon (INF)-γ, IL-2 e Fator de Necrose Tumoral (TNF)-α, resultando em uma diferenciação de macrófagos, células NK e células T citotóxicas, que estão envolvidas na fagocitose e destruição de bactérias invasoras e corpos estranhos. A imunidade Th2 (imunidade humoral), por sua vez, é caracterizada pela produção de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4, IL-10 e IL-13, resultando na diferenciação de eosinófilos, mastócitos e células B, que leva a uma defesa a antígenos mediada por anticorpos (WEBSTER; TONELLI; STERNBERG, 2002; ELENKOV, 2004; ZHAO et al., 2012). Neste contexto, acredita-se que a mudança de perfil de citocinas induzida pelos glicocorticóides seja consequência de uma regulação negativa das citocinas Th1, assim permitindo a expressão dominante de citocinas Th2 (FRANCHIMONT et al., 2000; AGARWAL; MARSHALL, 2001; ZHAO et al., 2012). Os glicocorticóides controlam a expressão de IL-12 e/ou de seu receptor, e esta regulação parece ser o mecanismo principal pelo qual eles medeiam à mudança no perfil das citocinas (ELENKOV; CHROUSOS, 1999; ELENKOV, 2004). De fato, os glicocorticóides inibem a produção aguda de citocinas, mas, em ultima instância, o que fazem é favorecer uma mudança de citocinas Th1 para um padrão de diferenciação de perfil Th2 (LIBERMAN et al., 2007a). Acredita-se que este desbalanço aconteça porque os glicocorticóides ativam seus receptores, que por sua vez, bloqueiam a atividade transcricional de T-bet, o principal fator de transcrição envolvido na imunidade celular (Th1), pelo mecanismo de transrepressão, descrito acima (LIBERMAN et al., 2007b; LAZAREVIC; GLIMCHER, 2011). Além disso, os glicocorticóides inibem o RNAm, a expressão de proteínas e a ativação transcricional de GATA-3, o fator de transição chave

envolvido na resposta imune humoral (Th2). Esses efeitos ocorrem através de uma inibição da fosforização de GATA-3 via PKA/p38 MAPK induzida por AMPc (LIBERMAN et al., 2009). A maior sensibilidade de inibição de T-bet com relação à GATA-3 ajuda a entender a indução do perfil Th2 exercido pelos glicocorticóides, principalmente após ocorrência de um estresse crônico ou após tratamentos prolongados com glicocorticoides exógenos (LIBERMAN et al., 2009; LAZAREVIC; GLIMCHER, 2011).

Como se mencionou, outra via relevante na comunicação do SNC como o SI é o Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNAS). Salienta-se, no entanto, que as atividades do eixo HPA e do SNAS estão profundamente interconectadas e, também, que o SNAS, embora denominado autônomo, é controlado pelo SNC (DEL REY; BESEDOVSKY, 2008).

Nos últimos 30 anos as catecolaminas, adrenalina e NA, tem sido descritas na literatura como importantes imunomoduladores após exposição a estimulos estressores, uma vez que ao atuar em adrenoceptores β (KOHM; SANDERS, 2000; NANCE; SANDERS, 2007b), aumentam ou suprimem a atividade de células imunes, incluindo-se aqui a proliferação celular, a produção de citocinas e de anticorpos, a atividade lítica e a migração celular (FELTEN et al., 1988; MADDEN et al., 1989; 1994a; 1994b; MADDEN; SANDERS; FELTEN, 1995; KELLEY et al., 1996; DEL REY; BESEDOVSKY, 2008; ARMAIZ-PENA et al., 2012).

A ativação do SNAS em resposta a um estimulo estressor resulta na liberação de catecolaminas da medula da glândula adrenal e dos terminais de inervações simpáticas. Felten e colaboradores (1987) fizeram a primeira descrição da inervação catecolaminérgica em órgãos linfóides como o timo e o baço de camundongos; mais tarde, suas análises mostraram que as inervações simpáticas também estavam presentes nos linfonodos, na medula óssea e no intestino. De forma mais surpreendente para a época, eles descreveram a presença de inervações catecolaminérgicas localizadas em justaposição com células ligadas à imunidade inata e adquirida, formando verdadeiras conexões “sinápticas” com leucócitos individuais (FELTEN et al., 1987).

Com algumas exceções, o SNAS tem sido frequentemente considerado como um sistema que exerce principalmente efeitos imunossupressores. Neste sentido, muitos trabalhos de literatura têm descrito resultados contraditórios, deixando de esclarecer os mecanismos pelos quais os efeitos descritos acontecem. De qualquer forma, estudos *in vivo* e *in vitro*, demonstraram que a NA pode inibir ou estimular uma resposta imune dependendo de inúmeras variáveis, como: o tipo de receptor adrenérgico envolvido, o antígeno utilizado

como estimulo/desfio, a dose de uma molécula agonista, e os subtipos celulares envolvidos (DEL REY; BESEDOVSKY, 2008). Por exemplo, mostrou-se que células B expressam duas vezes mais receptores β2 adrenérgicos do que as células T CD4+; receptores β2 adrenérgicos estão presentes em quase todas as células do sistema imune, inclusive nos macrófagos, com exceção dos clones tipo Th2 (DE BLASI; PARRUTI; SALLESE, 1995). Já os receptores α2 adrenérgicos somente são expressos em linfócitos T e B, durante estados específicos de doenças, como doenças autoimunes, por exemplo, na artrite reumatóide (HEIJNEN et al., 1996).

O estresse, dessa forma, ativa o SNAS, aumentando a liberação de noradrenalina pelos terminais nervosos. Essa molécula atuando sobre as células imunes, causa imunossupressão e, consequentemente, aumenta a susceptibilidade a patógenos. Essa afirmativa vem sendo comprovada por experimentos que buscam correlacionar o bloqueio das inervações simpáticas com as decorrências a desafios por bactérias. Rice et al. (2002), monstraram que a simpatectomia química por 6-hidroxidopamina (6-OHDA), uma substância que destrói terminações nervosas noradrenérgicas, aumentou a porcentagem de neutrófilos no baço e o número de macrófagos peritoneais em camundongos (RICE et al., 2002b; a). Ainda, a administração de 6-OHDA em camundongos infectados com *Listeria monocytogenes* diminuiu o número de unidades formadoras de colônias (CFU), aumentou o numero de neutrófilos durante a resposta imune e diminuiu o número de linfócitos no baço e a secreção de IL-2 e INF-γ por células induzindo, uma diminuição da reposta imune adquirida para a infecção (RICE et al., 2001).

Os estudos conduzidos com estresse têm grande importância quando se trata de animais de produção. A grande competição comercial e a crescente preocupação com o bem-estar destes animais tornam necessário que se estabeleçam padrões mínimos de ambiência e bem-estar, que por sua vez, têm sido regulados por leis no Brasil e em outros países. Como salientado, o Brasil se destaca no mercado internacional de produtos de origem animal, que têm se tornado cada vez mais exigente em relação à qualidade dos nossos produtos e, também com questões ligadas ao meio ambiente e à manutenção do bem-estar dos animais de criação.

De tudo quanto exposto, percebe-se que já está bem estabelecida a existência de interações neuroendocrinoimunologicas em mamíferos. Entretanto, estas inter-relações não têm sido frequentemente analisadas em aves. Neste sentido, alguns pesquisadores vêm mostrando a existência de relações 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). Em nossos laboratórios, constatamos que o estresse por aumento da densidade populacional (16 animais/m²) foi capaz de diminuir a atividade de macrófagos, de causar lesão intestinal e, consequentemente de aumentar a invasão de *Salmonella enteritidis* para o fígado de frangos de corte (GOMES et al., 2013)[1]. Shini e colaboradores (2008b) mostraram que a administração de corticosterona, em níveis semelhantes ao alcançados durante o estresse, aumentou a relação heterofilo/linfócito e induziu mudanças ultraestruturais no tamanho, formato e granulação de heterófilos e nas características citoplasmáticas de linfócitos. A corticosterona também foi capaz de induzir um maior influxo de heterófilos imaturos para o sistema circulatório. Dentro desse contexto, Shini e colaboradores (2010) mostraram que níveis de corticosterona aumentados foram capazes de modular os níveis de citocinas e de quimiocinas. Esses autores observaram que o tratamento crônico com corticosterona diminuiu a expressão de RNAm para citocinas proinflamatórias (IL-1β, IL-6 e IL-18), sugerindo que os achados experimentais foram decorrência de uma diminuição da resposta imune.

Entretanto, não é só na produção de aves que se pode notar a existência de relações neuroimunes. Bovinos, ovinos, bubalinos e suínos submetidos a situações estressoras, apresentaram queda em parâmetros produtivos e imunológicos (MORROW-TESCH; MCGLONE; SALAK-JOHNSON, 1994; SEVI et al., 2001; KHONGDEE et al., 2006; GUPTA; EARLEY; CROWE, 2007; CAFE et al., 2011).

Foi, também, relatada a participação do SNAS na regulação da atividade do sistema imune em aves (CHENG, 2006). Nesse trabalho, o autor utilizando um agonista de receptores α-2 adrenérgicos, a Clonidina, usada para o tratamento de ansiedade em seres humanos, mostrou ter ela um efeito estimulante sobre o sistema imune, melhorando a resposta inflamatória por atuar diretamente no SI ou, alternativamente, no 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 neuroimunes, mostrou-se que a inoculação de LPS (lipopolissacarídeo) aumentou os níveis de corticosterona e, também, aumentou a temperatura corporal, produzindo

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

diminuição da ingestão de alimentos e comportamento doentio em frangos jovens (SELL; CROWE; KENT, 2003).

É relevante comentar ainda que o estresse, se mantido por tempo prolongado, produz lesões na mucosa do trato gastrintestinal de aves (COSEN-BINKER et al., 2004; MARTINDALE, 2005; QUINTEIRO-FILHO et al., 2010; DENG et al., 2012; QUINTEIRO-FILHO et al., 2012b). Lesões como essas prejudicam a digestão dos nutrientes bem como a homeostase da microbiota comensal do trato intestinal acarretando perdas de absorção, redução do ganho de peso e diminuição do consumo alimentar (ALLEN; DANFORTH; AUGUSTINE, 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, 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 interfeririam tanto com a absorção de nutrientes, como com a secreção de água e de sais pelo intestino (HUBEL, 1985) e, ainda, com os mecanismos de transporte celular. (TRISCHITTA; DENARO; FAGGIO, 1999). É, assim, lícito supor que os efeitos do estresse sobre a integridade da mucosa intestinal sejam consequência de ações diretas de fatores regulatórias locais (produzidos por células enteroendócrinas) ou indiretas, ligadas à microbiota intestinal, à atividade do eixo HPA, do SNAS ou a peptídeos endógenos. De fato, a ausência de hormônios da adrenal causa atrofia do epitélio intestinal e diminuição da produção de fatores celulares epiteliais, como SCF, IL-7 e IL-15; estes fatos são críticos para o desenvolvimento, ativação e sobrevida de linfócitos intra-epiteliais intestinais (WATANABE et al., 1995; FUJIHASHI et al., 1996; INAGAKI-OHARA et al., 1997).

2.2 MACRÓFAGOS

Os macrófagos foram inicialmente descritos por Elie Metchnikoff, em 1905, que através da observação de animais invertebrados e de mamíferos, relatou serem estas células dotadas de capacidade fagocítica, responsáveis por eliminar patógenos e manter a homeostase

dos tecidos (HIRSCH, 1959; MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009; LIU; YANG, 2012). A partir daí, foram definidas as bases do conceito de macrófagos ativados, com capacidades fagocíticas e resistentes a infecções bacterianas especificas (LIU; YANG, 2012).

Os macrófagos são originários da medula óssea, mais especificamente de células tronco hematopoiéticas que geram as células do sistema fagocítico mononuclear (MURRAY; WYNN, 2011). Na medula óssea, por influência de proteínas chamadas de fatores estimulantes de colônias, os monoblastos (células precursoras de monócitos) após uma mitose, dão origem aos promonócitos; após duas sucessivas mitoses, essas células são lançadas na circulação sanguínea onde são chamadas de monócitos e durante um período de poucos dias vão sendo sedimentadas/armazenadas em diversos órgãos do corpo, incluindo-se aqui o baço, que serve de reservatório de monócitos imaturos (GEISSMANN et al., 2010). Quando os monócitos migram da circulação e extravasam através do endotélio vascular, diferenciam para macrófagos ou células dendriticas (GEISSMANN et al., 2010; MURRAY; WYNN, 2011). Neste sentido, o papel primário dos monócitos é o de substituir macrófagos residentes velhos dos tecidos e, células dendriticas em estado quiescente durante um processo inflamatório. Macrófagos residentes são encontrados em inúmeros órgãos onde exercem um papel homeostático na remoção de células apoptóticas e servem de sentinelas a injurias e infecções (QURESHI, 2003).

Os macrófagos podem ser didaticamente divididos em sub-populações baseados na sua localização anatômica e em aspectos fenotípicos funcionais. Macrófagos residentes especializados incluem: osteoclastos (ossos), macrófagos alveolares (pulmões), histiocitos (tecido conectivo intersticial), células de Kuppfer (fígado). Os intestinos, também, são habitados por numerosos tipos de macrófagos e células dendriticas, células estas que apresentam papeis diferentes, porém que trabalham juntas para manter o equilíbrio com a microbiota e com antígenos alimentares (QURESHI, 2003). Outras subpopulações restritas de macrófagos patrulham sítios imunologicamente privilegiados, como, por exemplo, o cérebro através da microglia ou, até mesmo nos olhos e testículos onde assumem um papel remodelador e de manutenção da homeostase tecidual (QURESHI, 2003). Resumidamente, pode-se dizer que durante um processo infeccioso ou injuria tecidual, essas subpopulações de macrófagos específicos de tecidos fagocitam materiais estranhos e recrutam macrófagos adicionais e outras células imunes da circulação sanguínea (MURRAY; WYNN, 2011).

Dependendo do microambiente estabelecido em cada órgão, os macrófagos podem ser programados em diferentes subtipos de células; a heterogeneidade dos monócitos circulantes

pode pré-definir a polarização que essas células irão adquirir ao chegar a um tecido. Os macrófagos programados podem ser classificados em M1 e M2 (BISWAS et al., 2012; WHYTE et al., 2012). A diferenciação de macrófagos M1 ativados acontece pela ação de citocinas inflamatórias do tipo Th1 e produtos microbianos, como o LPS. Após sua ativação, tornam-se células potentes contra microorganismos e células tumorais, estando associados principalmente a processos inflamatórios denominados do tipo 1. Os macrófagos M1 expressam a maioria dos TLRs e receptores de opsonização; secretam IL-12, TNF-α, IL-1β, IL-6, CXCL10 e CCL 5, expressam iNOS (sigla do termo em inglês "*inducible NO synthase*") (GORDON, 2003; BISWAS et al., 2012). Por outro lado, os macrófagos M2 são caracterizados pela baixa secreção de IL-12 e podem ser divididos em 3 (três) diferentes subtipos: M2a (macrófagos ativados alternativos), induzidos por IL-4, IL-13 ou IL-21; M2b, macrófagos ativados induzidos por complexos imunes e agonistas de TLRs ou receptores IL-1; e M2c (macrófagos imunossupressivos), induzidos pela IL-10, TGF-β, ou glicocorticóides. Assim, muitos pesquisadores têm posicionado os macrófagos M2b e M2c como sendo macrófagos reguladores (MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009; GORDON; MARTINEZ, 2010; MARTINEZ, 2012). Os macrófagos M2 melhoram a resposta inflamatórias do tipo 1 e a imunidade adaptativa, além de promover e regular as respostas inflamatórias do tipo 2, a angiogenese e a reparação tecidual. As células M2, mais especificamente a M2a, apresentam abundante expressão de receptores de manose, e são ativados por inúmeras quimiocinas (CCL17, CCL22, CCL24 entre outras). Portanto, nota-se um enorme repertório de ligações que podem ser estabelecidas com os macrófagos, que aumentam o leque para possíveis estratégias terapêuticas e para a ação de imunomoduladores (LIU; YANG, 2012).

Os macrófagos são células que atuam tanto na imunidade inata como na imunidade adquirida, exercendo papel protetor tecidual e atividade contra patógenos. Para desempenhar tal finalidade, os macrófagos apresentam receptores, dentre eles os chamados receptores *scavenger*, receptores de lectina tipo C que facilitam a remoção de células antigas, material tóxico ou provenientes de necroses, mantendo dessa forma a integridade dos tecidos (GOERDT et al., 1999). Além disso, uma vez que recebem uma variedade de estímulos advindos de processos infecciosos e lesões teciduais, os macrófagos podem expressar receptores PRR (sigla do termo em inglês *parttern-recognition receptors*), que incluem os receptores do tipo *toll* (TLRs), receptores helicoídais do tipo 1 induzidos por ácido retinóico (RLH) e receptores tipo Nod, todos esses capazes de reconhecer sinais de perigo ao

organismo (GORDON, 2003). A presença desses receptores é importante, pois a partir deles iniciam-se a resposta imune inata e a produção de moléculas que auxiliam os processos inflamatórios; por exemplo, a estimulação de um TLR nos macrófagos, induz uma cascata sinalizadora mediada por *MyD88* e TRIF, que modifica a expressão de NF-κB e IRF, que atuam na expressão de denfesinas, citocinas e quimiocinas (ISHII et al., 2009; MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009). Muitos TLRs podem ser encontrados em vacúolos intracelulares dos macrófagos, tendo papel importante no reconhecimento de patógenos intracelulares. Vírus citosólicos e produtos bacterianos são reconhecidos pelos receptores NOD e RLH. Tanto os NOD como os RLH presentes nos macrófagos induzem a expressão de NF-κB; entretanto, o primeiro destes receptores pode atuar diretamente sobre o gene ou em colaboração com os TLRs, enquanto o segundo ativa através de mediadores localizados na membrana externa das mitocôndrias ou, ainda, induzindo mediadores apoptóticos da caspase-1 através do adaptador molecular ASC (ISHII et al., 2009; MURRAY; WYNN, 2011; LIU; YANG, 2012; SELEDTSOV; SELEDTSOVA, 2012).

Através de uma complexa rede de sistemas regulatórios, os macrófagos orquestram a iniciação e a resolução do processo inflamatório. O inicio da resposta inflamatória acontece com a participação dos macrófagos M1, que destruem microorganismos invasores e células tumorais. Provêm daí, repostas do tipo Th1, através da geração do *burst oxidativo* e produção de citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, TNF-α, IL-1β e IL-12. Por outro lado, a resolução do processo inflamatório é orquestrada por células M2. Essas células são hiporresponsivas a estímulos pró-inflamatórios e estão envolvidas na limpeza de debris celulares, angiogenese, remodulação tecidual, cicatrização de feridas, e promoção da resposta do tipo Th2. Os macrófagos secretam citocinas e quimiocinas, assim como matriz metaloprotéica e inibidores teciduais que regulam o recrutamento de células para o reparo tecidual (LIU; YANG, 2012).

Em termos gerais, as funções dos macrófagos podem ser definidas como: quimiotaxia, fagocitose, destruição de bactérias e células tumorais, e produção de citocinas. Essas funções podem ser moduladas por fatores como nutrição, genética e meio ambiente, em especial o estresse por calor (QURESHI; HEGGEN; HUSSAIN, 2000; QURESHI, 2003).

A fagocitose vem sendo classificada como a função evolutivamente mais conservada dos macrófagos (QURESHI, 2003), sendo realizada através de diversos mecanismos. Em termos gerais, ela tem inicio com o reconhecimento da partícula a ser fagocitada pelo imunócito, sendo este reconhecimento processado por receptores específicos presentes na

superfície de sua membrana plasmática, como, por exemplo, os receptores manose/frutose (MRF) e para as frações Fc da imunoglobulina G (IgG) e do componente C3 do sistema complemento (ADEREM; UNDERHILL, 1999; MURRAY; WYNN, 2011). A ativação desses receptores desencadeia um processo de polimerização de filamentos de actina, próximos à membrana plasmática, que culmina com a emissão de pseudópodes e a formação do fagossomo, o qual passa por alterações em sua composição produzindo uma organela híbrida, chamada fagolisossomo, que, ao contrario do seu percussor, não tem capacidade de matar patógenos ou de degradar proteínas. Entretanto, esta estrtura possui inúmeras propriedades degradativas, tais como baixo pH, enzimas hidrolíticas para a digestão de partículas, defensinas e outros peptídeos bactericidas, além de produzir metabólitos reativos de oxigênio e nitrogênio (VIEIRA; BOTELHO; GRINSTEIN, 2002; TIZARD, 2009). Na sequência, fragmentos peptídicos antigênicos oriundos da atividade microbicida do macrófago, são exteriorizados na superfície da membrana pelo complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC II) sendo apresentados às células imunocompetentes (MURRAY; WYNN, 2011).

Como o proprio nome sugere, os macrófagos inflamatórios são estimulados por fatores inflamatórios não específicos, enquanto os macrófagos ativados são estimulados por fatores imunológicos, via produtos derivados de linfócitos; os macrófagos inflamatórios podem ser obtidos através da inoculação de agentes irritantes, como é o caso do SEPHADEX (QURESHI, 2003). Essa sílica vem sendo utilizada para adquirir macrófagos peritoneais de aves, uma vez que nessa espécie, ao contrario que se observa em roedores, não se encontram macrófagos residentes no peritônio (QURESHI, 2003). Entretanto, a ativação de macrófagos de aves pode ser obtida utilizando-se patógenos como micobactérias, *Trypanosoma cruzi*, *Salmonella spp*, ou simplesmente lipopolissacarideo (LPS) bacteriano; citocinas produzidas por linfócitos T ativados, em especial INF-γ também ativam macrófagos (BORDEN et al., 2007). Esses macrófagos ativados secretam substâncias importantes para a resposta imune, dentre os quais pode-se citar o sistema complemento, a citocinas (IL-1, TNF-α, IL-6 entre outras), as EROs e as espécies reativas de nitrogênio, como o NO (BISWAS et al., 2012). Afirmou-se, ainda, que o papel chave para o INF-γ (produzido por linfócitos Th1) teria o a função de ativar o arsenal antimicrobiano dos macrófagos (BORDEN et al., 2007).

Considerando-se o envolvimento dos macrófagos nas relações neuroimunos, fica claro que estados emocionais alternadas pelo estresse como pela ansiedade têm potencial para podem interferir com a atividade dessas células (PALERMO NETO; MASSOCO; FAVARE,

2001b; PALERMO-NETO; DE OLIVEIRA MASSOCO; ROBESPIERRE DE SOUZA, 2003). Ottaviani, Franchini e Franceschi em 1997 sugeriram ser o macrófago o melhor exemplo de célula imune-neuroendocrina, uma vez que essas células respondem a inúmeros mediadores hormonais, neurotransmissores e citocinas (OTTAVIANI; FRANCHINI; FRANCESCHI, 1997). De fato, macrófagos apresentam receptores para glicocorticóides e receptores β-adrenérgicos, sendo influenciados tanto pelo eixo HPA como pelo SNAS (MADDEN; SANDERS; FELTEN, 1995). Desta forma, a capacidade funcional dos macrófagos pode ser modificada através da ação dos hormônios e neurotransmissores mobilizados pelo estresse. Diversos trabalhos do nosso e de outros laboratórios têm demonstrado que a exposição de roedores a uma situação de estresse, seja na fase pré natal como seja na fase adulta, alteram a capacidade funcional dos macrófagos, fato também relatado por nosso grupo em frangos de corte (PALERMO NETO; MASSOCO; FAVARE, 2001b; FONSECA; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2002; PALERMO-NETO; DE OLIVEIRA MASSOCO; ROBESPIERRE DE SOUZA, 2003; QUINTEIRO-FILHO et al., 2010; QUINTEIRO-FILHO et al., 2012b; DE SOUZA QUEIROZ et al., 2013).

2.3 ESTRESSE POR CALOR E SUAS CONSEQUÊNCIAS

O estresse por calor é motivo de preocupação na avicultura brasileira. Após anos de estudos sobre a fisiologia da regulação térmica das aves, mostrou-se a importância de mantê-las em temperaturas ideais, isto é, deixa-las em situações térmicas confortáveis desde a eclosão até o momento em que são abatidas. Como já salientado, estressores ambientais, nutricionais, físicos, sociais ou fisiológicos estão diretamente envolvidos com o bem estar e como desenvolvimento dos animais (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 ele ocorre próximo ao momento do abate (FURLAN, 2006). De fato, a zona de conforto térmico dos frangos de corte deve ser reduzida de 35°C para 24°C às 4 semanas de idade e para 21-22°C às 6 semanas de idade, fato consequente à maturação do sistema termorregulador e ao aumento das reservas energéticas (FURLAN, 2006).

Inúmeros problemas podem estar relacionados à elevada temperatura ambiental. Na vigência de altas temperaturas ambientes, a taxa de crescimento é diminuída em função tanto da queda de apetite como do consumo alimentar (MORROW-TESCH; MCGLONE; SALAK-JOHNSON, 1994; QUINTEIRO-FILHO et al., 2010); o estresse por calor diminui o peso da carcaça, além de diminuir o rendimento e qualidade da carne de frangos de corte (ZHANG et al., 2012); em galinhas poedeiras, o estresse por calor também diminui o desempenho produtivo e a qualidade dos ovos (menor expessura de casca) (BOZKURT et al., 2012; EBEID; SUZUKI; SUGIYAMA, 2012). Cita-se, também, na literatura a ocorrência de aumento da frequência respiratória em aves estressadas por calor, fato que pode levar à alcalose metabólica (FRANCI et al., 1996).

Durante o estresse por calor, podem ocorrer desajustes fisiológicos (desequilíbrio eletrolítico), hormonais (corticosterona, T3, T4) e moleculares (MORROW-TESCH; MCGLONE; SALAK-JOHNSON, 1994; GERAERT; PADILHA; GUILLAUMIN, 1996; LIN et al., 2002; QUINTEIRO-FILHO et al., 2010). Temperaturas ambientais elevadas causam efeitos adversos na estrutura e na fisiologia das células; mais especificamente, na transcrição, na tradução do mRNA, e na função e estrutura das membranas celulares (IWAGAMI, 1996). Em conjunto, esses fatores debilitam o organismo animal, aumentando sua suscetibilidade às doenças oportunistas. (KAMWANJA et al., 1994). Nesse sentido, a suscetibilidade às doenças tem sido relacionada a desajustes na resposta imune das aves. De fato, nossos trabalhos já mostraram que altas temperaturas ambientes correlacionaram-se positivamente com um aumento de processos inflamatórios na mucosa intestinal (QUINTEIRO-FILHO et al., 2010; 2012b).

Outros autores, também, mostraram ser o estresse por calor, aplicado em períodos próximos ao dia de abate (42 dias), capaz de interferir com a reposta imune de aves; mais especificamente, relataram ocorrência de diminuição do numero de linfócitos circulantes e dos títulos de anticorpos (TROUT; MASHALY, 1994; KHAJAVI et al., 2003; MASHALY et al., 2004).

Neste mesmo contexto, (BARTLETT; 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 a atividade dos macrófagos. Mais especificamente, os autores

mostraram que 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 *per se* 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 produzidos pelo estresse térmico sobre a atividade dos macrófagos.

Nossos trabalhos corroboram com esses achados, pois quando frangos de corte foram submetidos ao calor ambiente de 31±1ºC e/ou 36±1ºC (10h/dia por 6 dias) observamos diminuição no *burst* oxidativo de macrófagos na presença de *S. aureus*; porém, e curiosamente, apenas a temperatura de 31±1ºC aplicada por 6 dias diminuiu o *burst* oxidativo basal (QUINTEIRO-FILHO et al., 2010). Observamos, também, aumento dos níveis séricos de corticosterona e presença de discreta enterite caracterizada por aumento de infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário na lamina própria do jejuno. Tomados em seu conjunto, os nossos dados permitiram sugerir 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 a imunidade, propiciado do aparecimento de processos inflamatórios intestinais e, consequentemente, piorando o desempenho produtivo Ressalta-se que em nossos dados experimentais não permitem descartar ou confirmar a participação do SNAS.

As barreiras intestinais são formadas por enterócitos, junções entre as células (*tigh junctions*), muco e fatores imunológicos, como macrófagos e linfócitos, sendo consideradas como a primeira linha de defesa do organismo contra invasões por microorganismos (CHEROUTRE; MADAKAMUTIL, 2004). Nesse sentido, sabe-se que inúmeros tipos de estressores, inclusive o estresse térmico por calor, produzem disfunção dessa barreira e, com isso, aumentam a permeabilidade intestinal a agentes invasores (LAMBERT, 2008). Burkholder et al. (2008) mostraram, em frangos submetidos a um estresse por calor (30ºC) durante 24 horas, um aumento na adesão de *Salmonella enteritidis* na mucosa do intestino delgado, além de alterações na microbiota comensal e na integridade da mucosa, mais especificamente, na profundidade das criptas do íleo. Quinteiro-Filho e colaboradores (2012b) observaram que a aplicação de um estresse por calor (31°C) por 10h, foi capaz de diminuir a atividade de macrófagos peritoneais e de aumentar os processos inflamatórios no intestino delgado de frangos de corte, sugerindo os achados experimentais que aves submetidas a estresse por calor, têm perda significativa da integridade intestinal. Assim, o aumento da

permeabilidade para endotoxinas bacterianas e/ou para bactérias da microbiota intestinal poderia propiciar o desenvolvimento de reações inflamatórias sistêmicas e locais. De fato, alguns estudos já mostraram a capacidade apresentada de algumas bactérias da microbiota de camundongos de migrarem para os órgãos linfóides e para o fígado, podendo, até mesmo, alcançar o pulmão quando de situações de estresse crônico; neste trabalho, também se relacionou a migração bacteriana a disfunções imunológicas ocorridas na barreira intestinal e a fatores ligados ao processo de migração (KIANK; DAESCHLEIN; SCHUETT, 2008).

O estresse suprime a resposta de uma serie de genes, exceto um grupo de genes denominados "genes do choque térmico" (*heat shock genes*) (ZHEN et al., 2006). As *heat shock proteins* (*HSP* - proteínas do choque térmico) são transcritas a partir desses genes, e sua estrutura vem sendo conservada durante a evolução das espécies. Mostrou-se que as HSPs são críticas para a sobrevivência celular diante de um estresse por calor, e também, importantes para as condições normais de crescimento celular, já que elas estariam envolvidas na formação das estruturas terciárias e quartenárias das proteínas, principalmente de moléculas afetadas pelo calor ou por outro tipo de estressor (GETHING; SAMBROOK, 1992; FOSTER; BROWN, 1996; MEZQUITA et al., 2001; JOLESCH et al., 2012). Acredita-se que essas proteínas atuem como moléculas cicerones (*chaperones molecules*) ligando-se a outras proteínas celulares, atuando no transporte celular; dotadas de capacidade de se dobrar em estruturas secundárias, elas previnem a agregação proteica durante um estimulo estressor (CHIRICO; WATERS; BLOBEL, 1988; HARTL, 1996). A família das *HSP 70* pode ser destacada como uma das mais importantes HSPs. Acredita-se que as *HSP 70* estariam envolvidas na proteção celular contra estímulos fisiológicos e ambientais (MALOYAN; PALMON; HOROWITZ, 1999; PALMISANO; WINTON; DICKHOFF, 1999). As *HSP* 70 têm papel importante em processos, como ativação de outras proteínas e aparecimento doenças autoimunes humanas (BALER; WELCH; VOELLMY, 1992; ZHEN et al., 2006). Adicionalmente, há evidência de que as *HSP 70* estariam relacionadas com a aquisição de termo-tolerância, e com a recuperação mais rápida de uma desnaturação protéica induzida por calor (MALOYAN; PALMON; HOROWITZ, 1999; ZHEN et al., 2006).

Muitos estudos têm relacionado a atuação de HSP com a temperatura corpórea de aves (WANG; EDENS, 1993; YAHAV et al., 1997; GIVISIEZ et al., 1999), porém, e até o momento, há poucas informações que permitam relacionar a expressão das *HSP 70*, com as funções imunes e a resistência de aves domésticas a doenças na vigência de estressores (SOLEIMANI et al., 2012). Neste sentido, estudos realizados em mamíferos mostraram que

quando liberadas para o meio extracelular, as *HSP 70* ligam-se a antígenos e proteínas, formando complexos que atuariam como mensageiros para alertar a resposta imune contra patógenos ou outras alterações moleculares (JOLESCH et al., 2012).

De tudo quanto exposto, fica clara a importância de se estudar em aves os efeitos do estresse por calor (31ºC) sobre a imunidade e sobre a resposta a um desafio patogênico, no caso *Salmonella enteritidis*. Pretendemos com o presente trabalho analisar em frangos de corte os efeitos do estresse por calor sobre o desenvolvimento de uma infecção experiemental por *Salmonella enteritidis* e sua migração através da mucosa intestinal para baço, fígadoe medula óssea. Pretendemos ainda, correlacionar estes achados com outros dados de nosso grupo e/ou da literatura, interpretando-os dentro de uma perspectiva neuroimune.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Estudar, em frangos de corte, as relações existentes entre os efeitos do estresse por calor (31°C) sobre os índices zootécnicos, a imunidade, a integridade do trato intestinal e os níveis séricos de corticosterona, correlacionando os dados obtidos com a migração de *Samonella Enteritidis* para fígado, baço e medula óssea.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Pretende-se, em frangos de corte submetidos a um estresse por calor (31±1°C) aplicado entre o 35° a 41° dias de vida e infectados ou não experimentalmente com *Salmonella enteritidis*, analisar:

1) Os índices zootécnicos;
2) Os níveis plasmáticos de imunoglobulinas IgA e IgG;
3) Os níveis plasmáticos de INF-γ;
4) A expressão de IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, TGF-β, e INF- γ em baço e tonsila cecal;
5) A expressão AvBD-1, AvBD-2, AvBD-4 e AvBD-6;
6) A expressão do MyD88, TLR-2 (*toll-like receptor 2*) e TLR-4 (*toll-like receptor 4*) em baço e tonsila cecal;

7) A integridade do trato intestinal (duodeno, jejuno e íleo);

8) A migração bacteriana (*Salmonella enteritidis.*) pela mucosa intestinal, analisando a presença da bactéria em baço, fígado e medula óssea;

9) Os níveis séricos de corticosterona;

10) A expressão do gene hps70 (*heat shock protein 70);*

11) E, correlacionar os dados obtidos, interpretando-os dentro de uma perspectiva neuroimunológica;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 232 frangos de corte, da linhagem Ross, adquiridos de um incubatório comercial com 1 dia de vida; os animais foram mantidos nas dependências do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As aves foram alojadas no chão, em baias ou em câmaras isoladas, em ambiente com luz artificial e ciclo de 12h (12h claro/12h escuro). A ração foi fornecida em quantidades conhecidas para posterior analise do consumo alimentar e a água foi fornecida *ad libitum.*

O trabalho foi ralizado seguindo-se as normas do Comitê de Ética para o uso de animais de experimentação, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. (Protocolo nº 1798/2009).

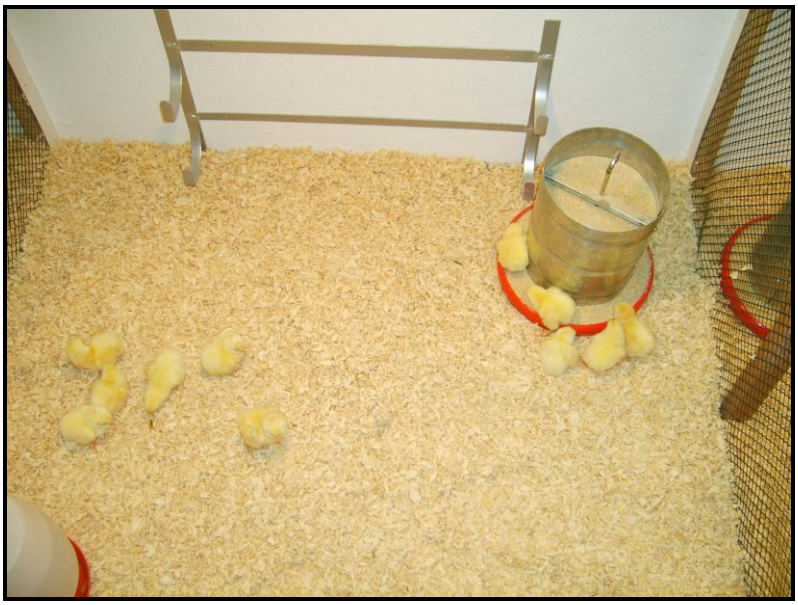
4.2 SALAS CLIMATIZADAS E ISOLADORES

Os experimentos foram divididos em dois grandes blocos. O primeiro bloco foi realizado para analisar os índices zootécnicos, os níveis de corticosterona e a migração de *Salmonella enteritidis*; o segundo bloco de experimentos analisou o restante dos parâmetros planejados a saber: niveis de IgA e IgG, níveis de INF-γ, expressão de citocinas, de defensinas aviárias, expressão de TLR-2, TLR-4 e MyD88 e integridade intestinal. No bloco 1 de experimentos, utilizaram-se 2 salas climatizadas, sendo cada uma delas divididas em 4 boxes de 1,2 m^2, com 12 animais cada. . As aves deste bloco foram alojadas em piso, com cama de maravalha, respeitando-se um limite máximo de 10 aves/m^2. As figuras 1, 2 e 3 ilustram os boxes dentro das salas.

Figura 1 – Estrutura interna de uma das salas climatizadas usadas no bloco 1 de experimentos

Figura 2 – Estrutura interna de uma das salas climatizadas usadas no bloco 1 de experimentos

Figura 3 – Box com aves de 1 (um) dia de vida



No segundo bloco de experimentos, foram utilizadas 4 (quatro) unidades isoladoras para aves (ALESCO®). Esses equipamentos são câmaras isoladas, que controlam o fluxo de entrada e saída de ar, sendo que o processo de filtragem do ar é realizado com auxilio de filtros HEPA. Dessa forma, nesse experimento foi possível obter um controle rígido de contaminantes ambientais. As câmaras isoladas foram alojadas em duas salas, sendo dois equipamentos mantidos em cada sala. Dois equipamentos de ar condicionado com funções de refrigeração e/ou aquecimento, além de aquecedores de ar e sistema de abastecimento de água foram instalados nas salas onde encontravam-se os isoladores. As Figuras 4, 5 e 6 ilustram os isoladores de aves utilizados.

Figura **4** – Isolador de Aves Alesco®

Figura 5 – Pintinhos de 1 dia alojados na Câmara Isoladora Alesco®

Figura 6 – Pintinhos de 1 dia alojados em Câmara Isoladora Alesco®

4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS E ESTRESSE TÉRMICO

As aves foram alojadas durante as primeiras 5 (cinco) semanas de criação nas temperaturas recomendadas para tal (35 ± 1°C do 1° até o 7° dia de vida, 28 ± 1°C do 7º até o 21° de vida; 24 ± 1°C do 22° dia até o 35° dia de vida). Em seguida, elas foram divididas em quatro grupos: 1) Controle; 2) Estresse por Calor 31±1 °C (*heat stress* - HS31°C); 3) Controle infectado com *Salmonella enteritidis* (PC) e; 4) Estresse por calor 31±1°C e infectado com *Salmonella enteritidis* (*positive heat stress* - PHS31°C). Durante a 6ª semana de vida dos animais (35° dia de vida dos animais até o 41° dia de vida), as aves foram mantidas em dois ambientes distintos (sendo a temperatura dos mesmos controlada através do auxílio de um condicionador de ar existente em cada uma das salas). Nestes ambientes, os animais dos grupos Controle (Controle e PC) permaneceram em temperatura termoneutra (21± 1°C) do 35º ao 41º dia de vida; os frangos dos grupos experimentais (HS31°C e PHS31°C) permaneceram em ambiente com calor térmico em temperatura que variou em torno de 31±1°C, 10h por dia (8:00 as 18:00). Foi permitido que a umidade relativa do ar flutuasse; entretanto, ela foi controlada de forma tal, a não cair para valores abaixo de 45%. Ao final do período experimental as aves foram eutanaziadas em câmara de CO2.

4.4 INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Foi utilizada uma cepa de *Salmonella enteritidis* isolada de ceco de frangos de corte que é mantida congelada no Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ-USP. Para inoculação, foi semeada uma colônia em meio caldo Difco® *Brain Heart Infusion* (BHI), e deixou-se sob aquecimento e agitação por 80 minutos até que se chegasse a uma concentração de 10^6 UFC/ 100µL. Os animais foram infectados no primeiro dia de vida; para tanto, receberam 100 µL de caldo BHI contendo as bactérias via *gavage* através de uma cânula. Os animais não infectados receberam apenas o caldo isento de bactérias. A figura 7 ilustra o procedimento descrito acima:

Figura 7– Inoculação experimental de *Salmonella Enteritidis* no primeiro dia de vida. Procedimento realizado em fluxo laminar

4.5 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO PRODUTIVO DAS AVES

O desempenho das aves foi determinado calculando-se o ganho de peso (GP), o consumo de alimento, a conversão alimentar (CA) 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, do 35º ao 42º dias de vida dos animais. Foram realizadas 4 replicações por grupo experimental (4 boxes com 12 animais cada), onde cada replicação representa uma unidade amostral (N).

4.6 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE CORTICOSTERONA

A coleta do sangue foi realizada após o período experimental (dia 42), pela veia braquial, na parte interior da asa; o sangue ccolhido foi armazenado em tubos do tipo eppendorfs de polietileno, sendo mantido em gelo até a retração do coágulo, e submetido a centrifugação refrigerada (3220g/15 minutos em temperatura de 4ºC) para obtenção do soro, que foi armazenado em freezer a -80ºC por um período máximo de 60 dias até o momento da realização das dosagens do glicocorticoide.

A dosagem de corticosterona foi realizada pela técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), utilizando-se kits comerciais (Enzo® Life Science, Farmingdale, NY), conforme descrito por Tachibana, et al. (2007). O kit utilizado apresenta sensibilidade (limite de detecção) de 27,0 pg/ml, com intervalo de detecção de 32 - 20,000 pg/ml.

4.7 ANÁLISE DA INTEGRIDADE DO TRATO GASTROINTESTINAL: EXAME ANATOMOPATOLÓGICO E MORFOMÉTRICO DO INTESTINO

Necropsia e coleta do trato intestinal

As aves necropsiadas tiveram seus tratos intestinais analisados pela técnica padrão de exame macroscópico. Fragmentos dos segmentos do duodeno, jejuno (aproximadamente 5cm posterior à abertura dos ductos pancreático e biliar) e íleo (aproximadamente 5cm anterior à junção íleo-cecal), foram colhidos para exame histopatológico no decorrer da necropsia; os órgãos colhidos foram fixados em Solução aquosa de formol a 10%. Posteriormente, as amostras foram processadas como abaixo descrito, para o exame histopatológico.

Exames anatomopatológico e semiquantitativo do intestino

As amostras de intestino foram processadas segundo a técnica padrão para exame microscópico de órgãos empregada no Laboratório de Histologia do VPT-FMVZ (HODGES, 1974; RIDDELL, 1987). Os cortes longitudinais e transversais dos segmentos de intestino foram corados com hematoxilina e eosina (HE).

Os segmentos intestinais foram avaliados quanto à estrutura geral (mucosa, submucosa e camadas musculares) e também 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 intraepiteliais. Seguiu-se um padrão histológico intestinal de normalidade pré-definido conforme sugerido por Hodges (1974) e Riddell (1987). A intensidade das alterações observadas no intestino foi avaliada semiquantitativamente em uma escala de 1 a 4, onde: 1= parâmetro tido como dentro da normalidade, 2 = presença de alterações mínimas, 3 = presença de alterações em grau moderado e 4 = presença de grau severo de alteração.

4.8 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Os procedimentos de análise microbiológica para os órgãos analisados foram adaptados conforme sugerido por Ferreira *et al* (2009).

Para avaliação da colonização e invasão de *Salmonella enteritidis*, os cecos, os papos, os fígados e os baços foram removidos com pinça e tesoura estéril, sendo acondicionados em sacos plásticos estéreis e previamente pesados. As amostras foram maceradas e em cada saco plástico colocou-se 10 ml (amostras de papo e baço) ou 20 ml (amostras de fígado e ceco) de água peptonada 0,1 %, pH 7,0. Uma amostra de 0,1ml do produto mascerado foi semeada no meio Agar XLT4 (Xylosine-Lysine-Tergitol-4, Difco/BD, USA). As placas foram mantidas em estufa a 37°C; as leituras foram realizadas 24, 48, 72 e 96 horas. As colônias onde se

suspeitou da presença de *Salmonella enteritidis* foram testadas com soro polivalente anti-*Salmonella* (Promicro-lot: 02839, Probac do Brasil, SP), através de teste de aglutinação. As amostras suspeitas foram mantidas sob agitação durante 2 minutos, para a certificação de ocorrência de aglutinação e, portanto identificação como *Salmonella*. Finalmente, calcularam-se as unidades formadoras de colônia de *Salmonella enteritidis* por grama (UFC/g) para as amostras de ceco, fígado e baço.

Análise de positividade para *Salmonella enteritidis*

Os procedimentos de coleta e maceração de ceco, papo, fígado e baço foram os mesmos descristos acima. Foi adicionado nas amostras maceradas, solução de Tetrationato (*Tetrathionate broth base*, Difco/BD, USA) para análise da positividade. As amostras foram incubadas a 37°C durante 48h e, após esse período, as amostras foram semeadas em meio Agar XLT4. As placas foram condicionadas em estufa a 37°C e as leituras foram realizadas após 48 horas.

Ainda, coletamos o fêmur direito dos animais, para realização da analise microbiológica da medula óssea dos animais. O fêmur direito foi dissecado, tendo suas epífises sido cortadas transversalmente. Uma agulha conectada a uma seringa plástica contendo 10ml de PBS foi, então inserida na medula femoral e as células foram retiradas fisicamente e lavadas. A suspensão celular foi então enriquecida com 10 ml de solução de tetrationato. As amostras foram incubadas e semeadas como descrito acima.

4.9 ANÁLISE DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE IgA E IgG

Foi realizada a coleta de sangue pela veia braquial, na parte interior da asa, sendo o sangue armazenado em tubos do tipo eppendorfs de polietileno com EDTA 10%. O sangue foi mantido em gelo, sendo em seguida centrifugado a (3220g/15 minutos a 4ºC) para obtenção do plasma, o qual foi armazenado em freezer a -80ºC por no máximo 30 dias até o momento

da realização das dosagens das imunoglobulinas. As dosagens de IgA e IgG foram realizadas por ELISA utilizando kits comerciais (*Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA*), conforme descrito por Gao et al (GAO et al., 2008). O kit utilizado apresenta sensibilidade (limite de detecção) de 15,62 ng/ml, com intervalo de detecção de 15,62 a 1000 ng/ml.

4.10 ANÁLISE DE CITOCINAS E DEFENSINAS AVIARIAS (AVBD)

Extração de RNA e PCR em tempo real

A técnica de PCR em tempo real, e a análise dos genes descritos foram realizadas no *Immunology Laboratory* do *Department of Pathobiology, Ontario Veterinary College, University Of Guelph – Canada*; em colaboração com o Prof. Dr. Shayan Sharif e sua equipe.

Foram realizadas colheitas dos baços e das tonsilas cecais das aves em nossos laboratórios no Brasil. Os órgãos foram colhidos de forma estéril e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas em freezer a -80ºC até o momento em que foram sbmetidas a extração do RNA.

O RNA total foi extraído das amostras de baço e tonsila cecal com auxílio do reagente Trizol (Invitrogem Canada Inc. Burlington, Ont., Canada) conforme descrito por Abdul Careem et al. (2006). Em seguida, o RNA total foi processado para sintetizar o cDNA, sendo utilizado um kit de trancriptase reversa conforme instruções do fabricante (*SuperScript First-Strand Synthesis System*, Invitrogem Live Tecnologies, Carlsband, CA, USA). O cDNA foi armazenado em freezer -20°C até a realização do PCR tempo real. Os protocolos de extração de RNA e síntese de cDNA vêm sendo detalhados em inúmeras publicações (ABDUL-CAREEM et al., 2007; BRISBIN et al., 2008; HAGHIGHI et al., 2008; BRISBIN et al., 2010; BRISBIN; PARVIZI; SHARIF, 2012).

O PCR em tempo real foi utilizado para quantificar a expressão gênica de citocinas nas amostras processadas de cDNA. As reações de PCR foram preparadas em um volume total de 20 µl, utilizando-se kit SYBR Green (LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I,

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). A sequência dos primers específicos para IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, TGF-beta, INF- γ, AvBD-1, AvBD-2, AvBD-4 e AvBD-6 de frangos de corte (*Gallus gallus*) estão descritos na tabela 1. (ABDUL-CAREEM et al., 2006; ABDUL-CAREEM et al., 2007; BRISBIN et al., 2010). Para a análise da expressão relativa dos genes descritos, foi utilizada a expressão de β-actina para as devidas comparações.

Os *primers* foram sintetizados pela Sigma-Aldrich Canadá Ltd. (Oakville, Ont., Canadá). Todas as amostras foram amplificadas em um aparelho de PCR tempo real – LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) e avaliadas em software 3.5 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha).

Tabela 1 – Sequência de *primers* de citocinas e AvBD que foram utilizadas nas reações de PCR em tempo real.

Primer	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
IL-1β	GTGAGGCTCAACATTGCGCTGTA	TGTCCAGGCGGTAGAAGATGAAG
IL-6	CAGGACGAGATGTGCAAGAA	TAGCACAGAGACTCGACGTT
IL-8	CCAAGCACACCTCTCTTCCA	GCAAGGTAGGACGCTGGTAA
IL-10	AGCAGATCAAGGAGACGTTC	ATCAGCAGGTACTCCTCGAT
IL-12	CTGAAGGTGCAGAAGCAGAG	CCAGCTCTGCCTTGTAGGTT
IL-13	ACTTGTCCAAGCTGAAGCTGTC	TCTTGCAGTCGGTCATGTTGTC
IL-17	GAAACGTCAATAGCCAGTTGC	TCCCATGCTCTTTCTCACAACA
TGF-β	CGGCCGACGATGAGTGGCTC	CGGGGCCCATCTCACAGGGA
INF-γ	CTGAAGAACTGGACAGAGAG	CACCAGCTTCTGTAAGATGC
AvBD1	GGTTCTTACTGCCTTGCTGT	TGACTTCCTTCCTAGAGCCT
AvBD2	GGACTGCCTGCCACATACAT	TTGCAGCAGGAACGGAAC
AvBD4	TACCTGCTGCTGTCTGTCCT	AGTCCACTGCCACATGATCC
AvBD6	TTGTGGCAGTTCATGGAG	ACTTCTGGAGATCCTGTGC
β-actina	CAACACAGTGCTGTCTGGTGG	ATCGTACTCCTGCTTGCTGAT

4.11 ANÁLISE DE *HSP70*, TLR-2, TLR-4, *MYD88*

A técnica de PCR em tempo real e, a análise dos genes descritos foram realizadas no *Immunology Laboratory* do *Department of Pathobiology, Ontario Veterinary College, University Of Guelph – Canada*; em colaboração com o Prof. Dr. Shayan Sharif e sua equipe.

A coleta dos baços e tonsilas cecais, a extração de RNA, a síntese do cDNA e a análise gênica por PCR em tempo real foram realizadas como descrito acima (item 4.10). Os *primers* utilizados para TLR-2, TLR-4, MyD88, HSP70 estão descritos na tabela 2. Os *primers* foram sintetizados pela Sigma-Aldrich Canadá Ltd. (Oakville, Ont., Canadá). Todas as amostras foram amplificadas em um aparelho de PCR tempo real – LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) sendo avaliadas em *software* 3.5 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). Para a análise da expressão relativa dos genes descritos, foi utilizada a expressão de β-actina para as devidas comparações.

Tabela 2 – Sequência de *primers* que foram utilizadas nas reações de PCR tempo real.

Primer	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
TLR-2	ATCCTGCTGGAGCCCATTCAGAG	TTGCTCTTCATCAGGAGGCCACTC
TLR-4	TGCCATCCCAACCCAACCACAG	ACACCCACTGAGCAGCACCAA
MyD88	AGCGTGGAGGAGGACTGCAAGAAG	CCGATCAAACACACACAGCTTCAG
HSP70	GCCAACAGAGATAGGGTGGG	TGATCACCTCCTGGCACTTG

4.12 DETECÇÃO DE *SALMONELLA ENTERITIDES* POR IMUNOHISTOQUÍMICA

Amostras de baço e ceco das aves de todos os grupos experimentais foram colhidas e armazenadas em freezer -80°C. Cortes congelados de 6µm foram obtidos do criostato (Leica®) em lâminas sinalizadas. Os tecidos foram fixados e pré-fixados em acetona e rehidratados em sessões graduais de álcool seguindo-se um protocolo padrão. Em seguida, os cortes foram submetidos ao bloqueio da peroxidase em solução de H2O2 3% diluído em metanol (5 minutos). As reações inespecíficas do tecido foram bloqueadas pelo uso de Protein Block (Dako®) (30 minutos à 37°C). Posteriormente, os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-Salmonella (Abcam - 1:20) em câmera úmida, por 12 horas (overnight) à 4°C. Realizou-se a incubação com anticorpo secundário biotinilado por 30 minutos, seguida da incubação com o complexo estreptavidina-peroxidase (LSAB - Dako®, CA, USA) (30 minutos). Os núcleos foram corados por Hematoxilina de Harris e as bactérias ou partes da mesma foram evidenciadas após a revelação por Diaminobenzidina (DAB+Chromogen, Dako®, CA, USA). As lâminas foram lavadas em PBS entre todas as etapas. As fotomicrografias foram realizadas por meio do software KS400. Utilizou-se um microscópio OLYMPUS® e uma câmera AxioCam® para o procedimento.

4.13 ANÁLISE DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE INF-γ

Foi realizada a coleta de sangue pela veia braquial, na parte interior da asa, sendo o sangue armazenado em tubos do tipo eppendorfs de polietileno com EDTA 10%. O sangue foi mantido em gelo, sendo em seguida centrifugado a (3220g/15 minutos a 4ºC) para obtenção do plasma, o qual foi armazenado em freezer a -80ºC por no máximo 30 dias até o momento da realização das dosagens das imunoglobulinas. As dosagens de INF-γ foram realizadas por ELISA utilizando kits comerciais (CUSABIO BIOTECH®, Wuhan, China), conforme descrito no manual estabelecido pelo fabricante. O kit utilizado apresenta sensibilidade (limite de detecção) de 2,00 pg/ml, com intervalo de detecção de 8 a 2000 pg/ml.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Antes de aplicar-se a análise estatística verificou-se através do teste de Bartlet, qual tipo de teste - paramétrico ou não paramétrico - seria o mais adequado para cada situação experimental. Os dados paramétricos foram avaliados por análise de variância ANOVA seguido do teste Newman-Keuls ou pelo teste “t” de Student. Já os dados não paramétricos foram analisados pelo teste “Ü” de Mann-Whitney ou pela análise de variância de uma via proposta por Kruskall-Wallyis com resolução pelo teste de Dunnet.

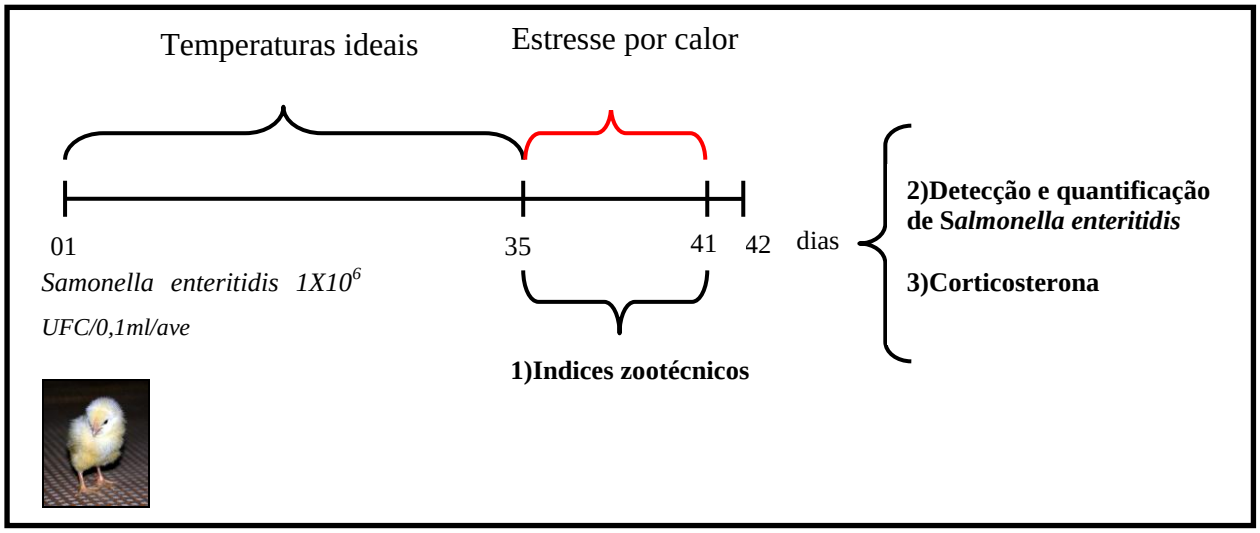
Para os parâmetros onde existiam dois fatores foi feita a análise de variância de duas vias seguida do teste de múltiplas comparações de Student-Newman-Keuls, para análise das interações entre os fatores. Em todos os casos, a probabilidade de $p<0,05$ foi considerada capaz de mostrar diferenças estatisticamente significantes.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

5.1 EXPERIMENTO 1: Avaliação dos índices zootécnicos de frangos de cortes infectados experimentalmente com *Salmonella enteritidis*, e submetidos ou não ao estresse térmico por calor (31±1°C)

Foram utilizados 192 frangos de corte, divididos ao acaso em 4 (quatro) grupos, sendo um grupo controle (grupo C), um estressado por calor (HS31°C) um grupo infectado com S*almonella enteritidis* (Controle Positivo - PC) e, finalmente, um grupo infectado com *Salmonella enteritidis* e estressado por calor (PHS31°C). Para este experimento, foram realizados dois lotes experimentais, utilizando-se duas salas climatizadas. A infecção experimental por *Salmonella enteritidis* foi realizada no 1º dia de vida das aves dos grupos PC e PHS31°C, conforme descrito no item 4.4. Os animais dos grupos controles (grupos C e PC) permaneceram em temperatura termoneutra do primeiro ao 42° dia de vida, e aquele dos grupos estressados (HS31°C e PHS31°C) foram mantidos em temperatura de 31±1°C, isto é, submetidos a um estresse térmico por calor, conforme descrito no item 4.3. Durante todo o período experimental (35º ao 42º dia de vida), foram analisados os **índices zootécnicos** conforme descrito no item 4.5. A figura 8 ilustra esse delineamento experimental.

Figura 8 – Esquema do protocolo experimental utilizado no experimento 1



5.1.1 Resultados

Índices Zootécnicos

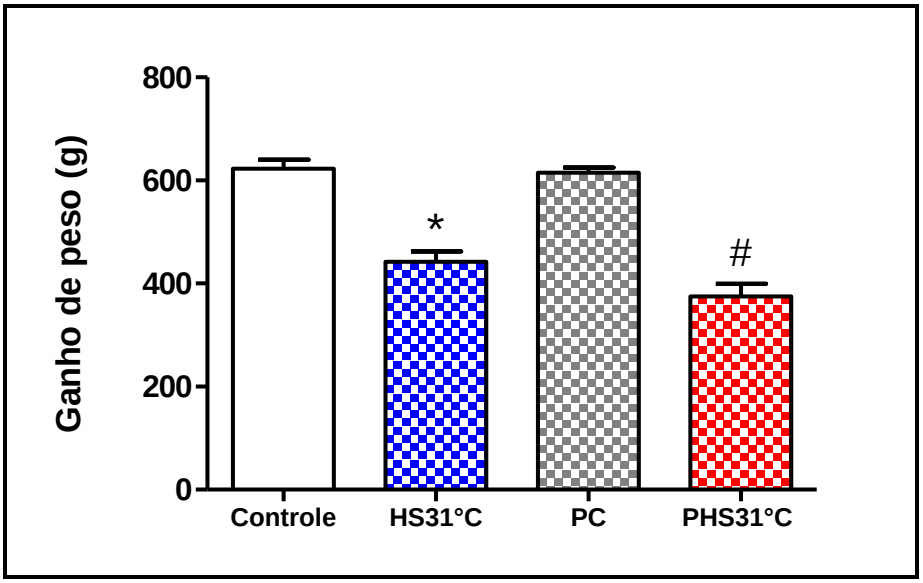
A tabela 3 mostra e as figuras 9, 10 e 11 ilustram os resultados desse experimento. Observamos que os índices zootécnicos analisados foram severamente afetados nas aves submetidas ao estresse térmico por calor (31±1°C) entre o 35º e o 41º dias de vida. O estresse por calor diminuiu o ganho de peso (F (3,12)=37,89; p<0,01) e o consumo de ração (F (3,12)=32,22; p<0,01) dos animais infectados (grupo PHS31°C) e não infectados (grupo HS31°C) com *Salmonella enteritidis*. Porém, não observamos interação entre os fatores "estresse por calor *vs* infecção por *salmonella*" (p=0,890) quer para o ganho de peso quer para o consumo de ração. Com relação à conversão alimentar (CA), observamos existência de uma interação positiva entre o estresse por calor e a infecção por Salmonella (F (3,12) = 9,61; p=0,008). De fato, o estresse por calor, sozinho, não alterou a CA em àquela medida nos animais do grupo controle (p>0,05). Entretanto, quando as aves foram infectados com *Samonella enteritidis* e estressadas, observamos aumento na CA em relação aos animais dos grupos PC e HS31°C (F (3,12)= 9,64; p<0.01). Não observamos mortalidade em nenhum dos grupos experimentais.

Tabela 3 – Efeitos do estresse por calor (31±1°C) sobre os índices zootécnicos de frangos de corte infectados com *Samonella enteritidis*

Parâmetro	Controle	HS31°C	PC	PHS31°C
Ganho de peso (g)	622,70±17,54	442,50±20,04 *	618,5±9,95	374,7±24,61 #
Consumo de ração (g)	1449±22,86	1139±37,78 *	1337±14,67	1017±39,32 #
Conversão Alimentar	2,45±0,06	2,51±0,09	2,16±0,02	2,73±0.11 #a
Mortalidade (%)	0	0	0	0

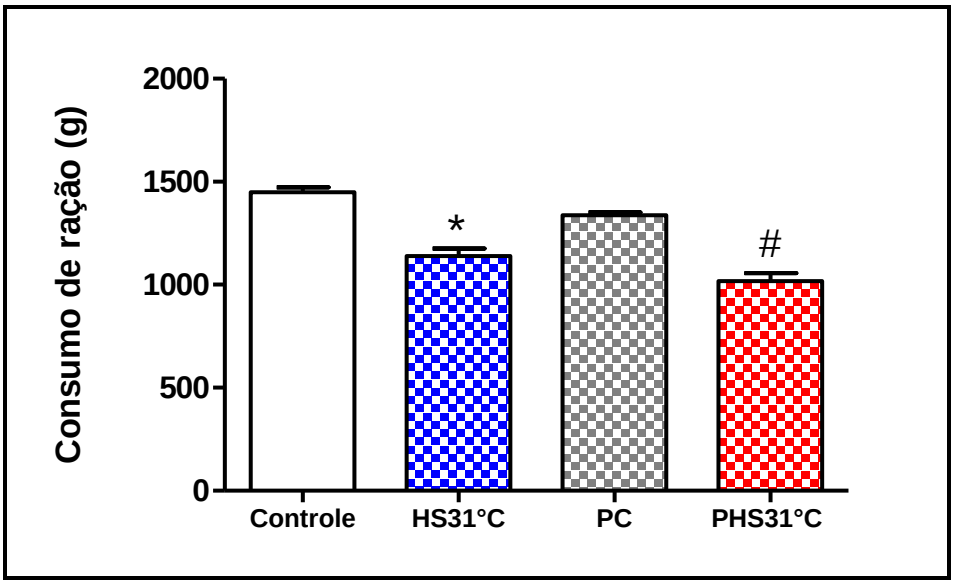
Os dados representam a média ± erro padrão; N=4 replicações com 12 animais por replicação.
*p<0,01 em relação ao grupo controle;
#p<0,01 em relação ao grupo controle positivo (*PC*);
ap<0,01 em relação ao grupo HS 31°C
ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls
ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls.

Figura 9 – Efeitos do estresse por calor sobre o ganho de peso de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis*



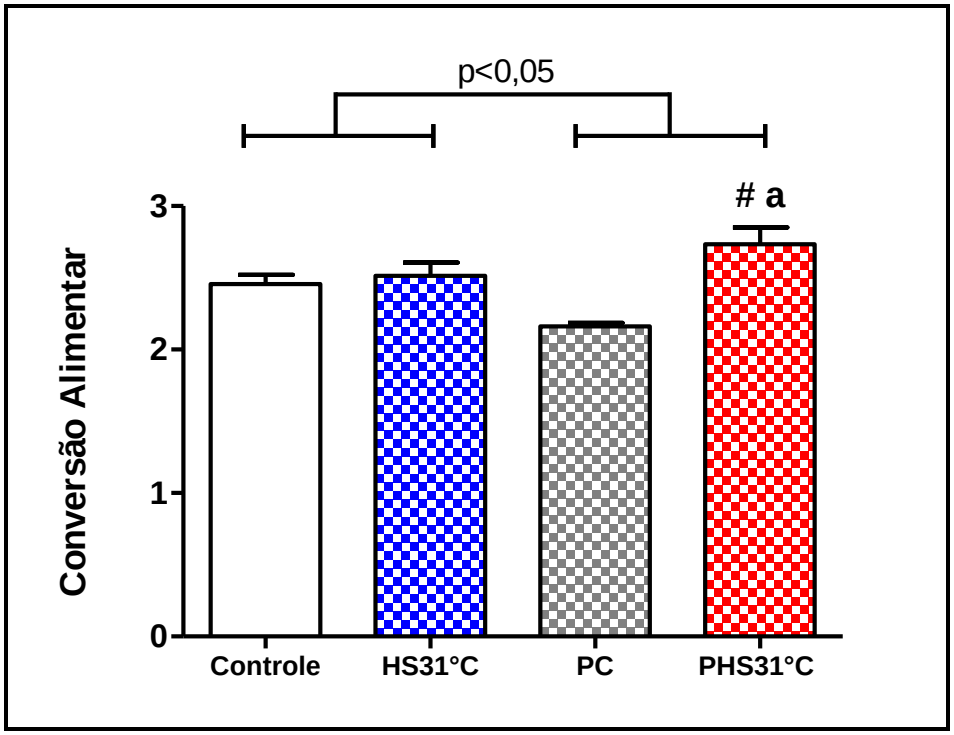
*p<0,01 em relação ao grupo Controle; #p=0,02 em relação ao grupo PC (ANOVA de uma via seguido pelo teste de múltiplas comparações Newman-Keuls). p>0,05 para interação entre o estresse por calor e a infecção por Salmonella enteritidis (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

Figura 10 – Efeitos do estresse por calor sobre o consumo de ração de frangos de corte infectados ou não por *Salmonella enteritidis*



*p<0,01 em relação ao grupo Controle; #p=0,02 em relação ao grupo PC. (ANOVA de uma via seguido pelo teste de múltiplas comparações Newman-Keuls). p>0,05 para interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis (*ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

Figura 11 – Efeitos do estresse por calor sobre a conversão alimentar (CA) de frangos de corte infectados ou não por *Salmonella enteritidis*



*p<0,01 em relação ao grupo Controle; #p=0,02 em relação ao grupo PC; ap=0,027 comparado como grupo HS31°C (ANOVA de uma via seguido pelo teste de múltiplas comparações Newman-Keuls). p<0,05 para interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis (*ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

5.2 EXPERIMENTO 2: Avaliação dos níveis séricos de corticosterona e da migração bacteriana em frangos de cortes infectados experimentalmente com *Salmonella enteritidis*, e submetidos ou não ao estresse térmico por calor (31±1°C)

Os mesmo animais do Experimento 1 foram utilizados no Experimento 2. Dessa forma, o mesmo delineamento experimental foi realizado neste momento. Assim, ao final do período do estresse (42° dia), o sangue dos animais foi colhido para (1) **análise dos níveis séricos de corticosterona** (item 4.6). Em seguida, os animais foram eutanaziados para a remoção asséptica do fígado, do baço e do ceco para posterior (2) **análise microbiológica**, conforme descrito no item 4.8. A figura 8 ilustra esse delineamento experimental.

5.2.1 Resultados

Corticosterona

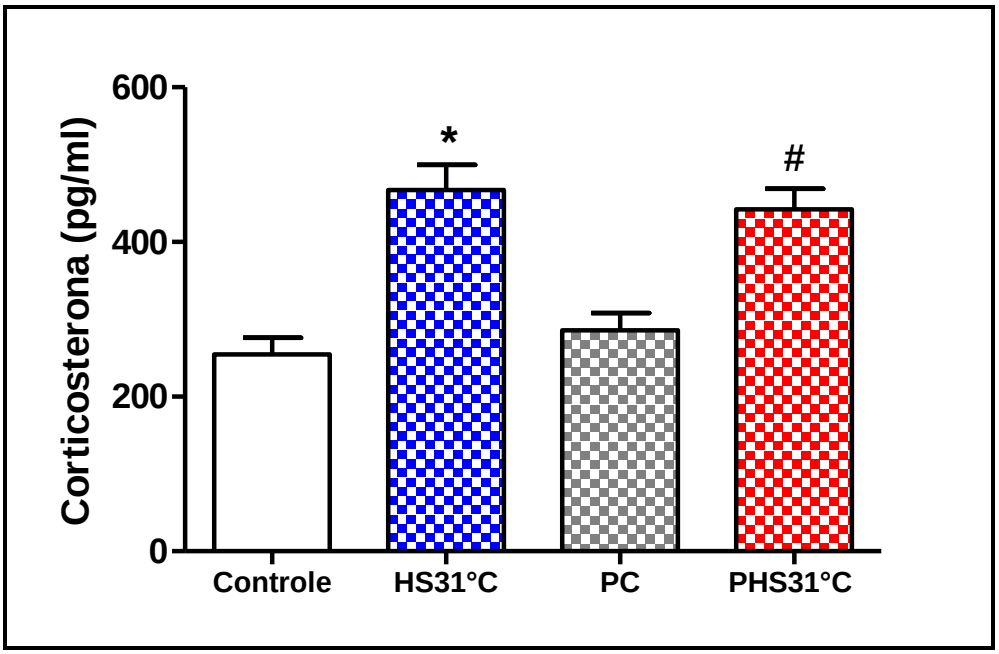
A tabela 4 mostra e a figura 12 ilustra os resultados obtidos em relação aos níveis séricos de corticosterona. As aves dos grupos HS31°C e PHS31°C apresentaram aumento dos níveis de corticosterona ($F (3,44)=16,86$; $P < 0.01$) quando comparadas àquelas dos grupos Controle e PC, respectivamente. Não foram observadas diferenças significantes entre os dados dos grupos HS31°C e PHS31°C ($p>0,05$). Também, não observamos presença de interações entre os fatores estresse e infecção por *Salmonella* ($p>0,05$).

Tabela 4 – Efeitos do estresse por calor sobre os níveis séricos de corticosterona em frangos de corte infectados ou não por *Salmonella enteritidis*

Parâmetro	Controle	HS31°C	PC	PHS31°C
Corticosterona (pg/ml)	254,9± 23.60	467,3±44.00*	285,8±22.24	442,5±26.36#

Os dados representam a média ± erro padrão. *p<0,05 em relação ao grupo Controle; #p<0,05 em relação ao grupo PC (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls). p>0,05 para interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis* (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

Figura 12 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre os níveis séricos de corticosterona (pg/ml) em frangos de corte infectados com *Samonella enteritidis*



Os resultados representam médias±erro padrão (n=10/grupo). *p<0,01 em relação ao grupo Controle; #p<0,01 em relação ao grupo PC (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls). p>0,05 para interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis (*ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

Migração de Salmonella enteritidis

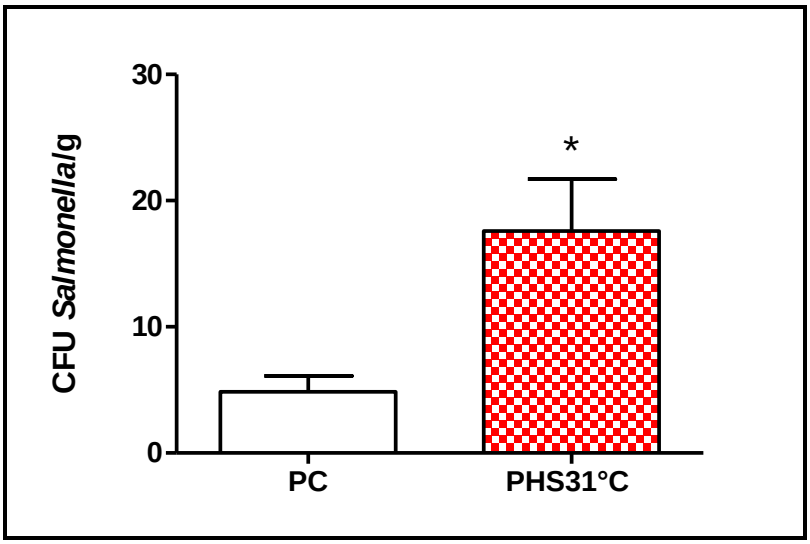
A tabela 5 mostra e a figura 13 ilustra os efeitos do estresse por calor (31±1ºC) sobre a migração de *Salmonella enteritidis* a partir do TGI. Primeiramente, não foram observadas contagens positivas de colônias (UFC) de *Salmonella enteritidis* em ceco e fígado em nenhum dos grupos. Porém, após enriquecimento das amostras em solução de tetrationato, observamos algumas amostras positivas provenientes desses órgãos, confirmando-se a ocorrência de infecção experimental por *Salmonella enteritidis.* Não observamos diferenças estatísticas na colonização do ceco entre os grupos PC e PHS31°C. Entretanto, o estresse por calor aumentou a migração de *Salmonella enteritidis* para o baço das aves do grupo PHS31°C quando comparadas com aquelas do grupo PC (t=4,92; p<0,01 - Figura 13). Amostras positivas para *Salmonella enteritidis* não foram observadas nas aves dos grupos C e HS31°C.

Tabela 5 – Efeitos do estresse por calor (31±1°C) sobre a colonização e invasão bacteriana em frangos de corte infectados ou não com *Samonella enteritidis*

Grupos	Media de Salmonella (cfu/g)[1]			Teste de positividade[3]		
	ceco	fígado	baço[2]	ceco	fígado	baço
Controle	0	0	0	0/20	0/20	0/20
HS31°C	0	0	0	0/20	0/20	0/20
PC	0	0	4,70±1,24	12/20	2/20	8/20
PHS31°C	0	0	18,37±4,13	11/20	2/20	9/20

Dados expressos em media±erro padrão
[1]Não foi detectado UFC de Salmonella nas amostras de ceco e fígado (Agar XLT4)
[2]n=8 amostras, *p<0,01 em relação ao grupo PC (teste "t" de Student)
[3] as amostras foram enriquecidas em meio tetrationato e semeadas em Agar XLT4 (positivos/total)

Figura 13 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a migração de *Salmonella enteritdis* para o baço de frangos de corte



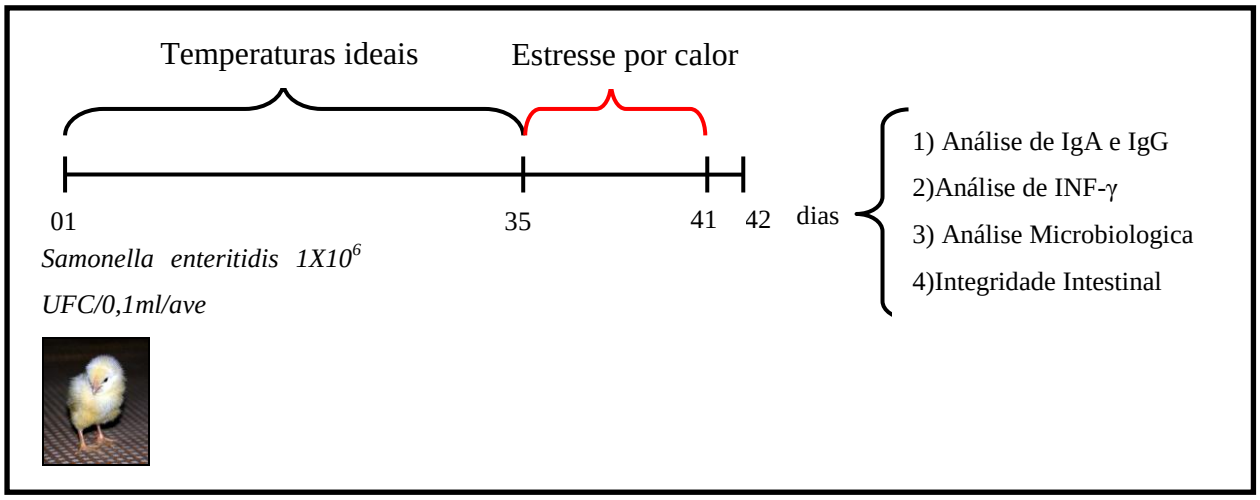
Os resultados representam médias±erro padrão (n=8/grupo). *p<0,01 em relação ao grupo controle positivo (teste "t" de Student).

5.3 EXPERIMENTO 3: Avaliação dos níveis plasmáticos de IgA, IgG, e INF-γ, integridade intestinal e da análise microbiológica de órgãos alvos de frangos de cortes infectados ou não com S*almonella enteritidis*, e submetidos ou não ao estresse por calor (31±1°C)

Foram utilizados 40 frangos de corte divididos ao acaso em quatro grupos, sendo um grupo controle (grupo C), um estressado por calor (HS31°C) um grupo infectado com S*almonella enteritidis* (Controle Positivo - PC) e, finalmente, um grupo infectado com *Salmonella enteritidis* e estressado por calor (PHS31°C). Este experimento foi realizado com o auxilio de 4 câmaras isoladoras, sendo uma para cada grupo experimental conforme descrito no item 4.2. Foi realizada uma infecção experimental por *Salmonella enteritidis* no 1º dia de vida das aves dos grupos PC e do HS31°C (item 4.4). Os animais dos grupos controles (grupos C e PC) permaneceram em temperatura termoneutra do primeiro ao 42° dia de vida, sendo os dos grupos estressados (HS31°C e PHS31°C), mantidos em temperatura de 31±1°C, isto é, submetidos a um estresse térmico por calor, conforme descrito no item 4.3. Ao final do período do estresse (42° dia), o sangue dos animais foi colhido para (1) **análise dos níveis plasmáticos de IgA e IgG** (item 4.9) e para (2) **análise dos níveis plasmáticos de INF-γ**

(item 4.13). Em seguida, os animais foram eutanaziados para a remoção asséptica do papo, ceco, fígado e baço, para (3) **análise microbiológica** (item 4.8 e 4.12). O fêmur direiro dos animais também foi coletado, sendo realizado a lavagem da medula óssea para posterior análise microbiológica. O intestino delgado foi coletado em três partes, duodeno, jejuno e íleo e separados para análise da (4) **integridade histopatológica** (item 4.7). A figura 14 ilustra esse delineamento experimental.

Figura 14 – Esquema do protocolo experimental utilizado no experimento 3



5.3.1 Resultados

Níveis plasmáticos de IgA e IgG

Com relação aos efeitos do estresse por calor sobre os níveis de imunoglobulinas, observamos que o estresse por calor foi capaz de diminuir os níveis plasmáticos de IgA ($F_{(3,36)}=4,71$; $p<0,05$) dos frangos de corte infectados com *Salmonella enteritidis* quando comparados com o controle positivos (grupo PC); porém, não observamos interação entre os

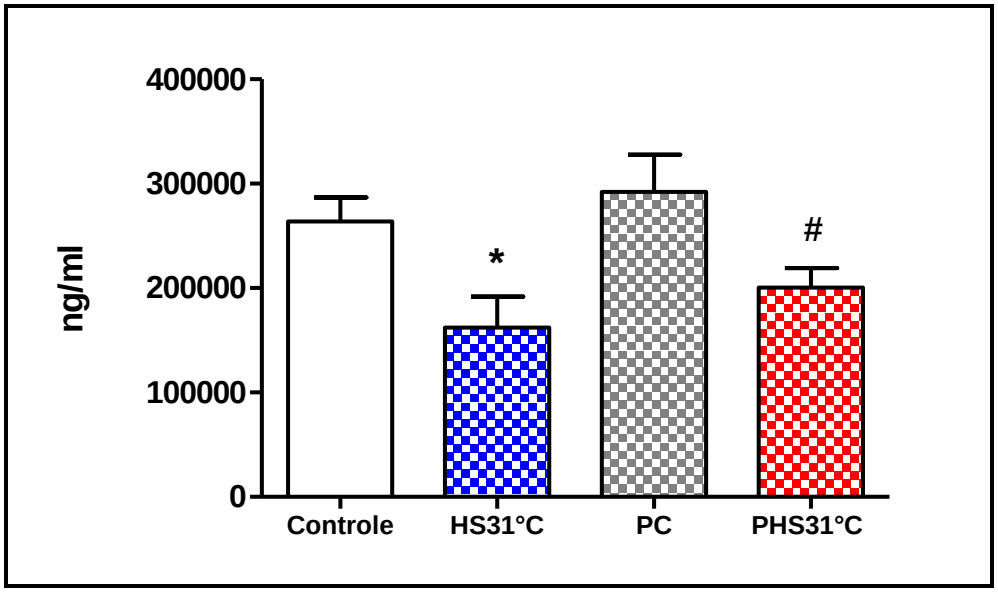
fatores estresse por calor *vs* infecção por *Salmonella* (p=0,810). Também, não obtivemos diferenças significantes entre os grupos ao analisar os níveis de IgG (p>0,05). A tabela 6 mostra e as figuras 15 e 16 ilustram os resultados.

Tabela 6 – Efeitos do estresse por calor sobre os níveis plasmáticos de IgA de frangos de corte infectados ou não por *Salmonella enteritidis*

Parâmetro	Controle	HS31°C	PC	PHS31°C
IgA (ng/ml)	263800 ± 25680	162300 ± 29410*	290800 ± 32040	200500 ± 18760 #
IgG (ng/ml)	549900± 45420	548600± 44370	586200± 42400	544900± 39700

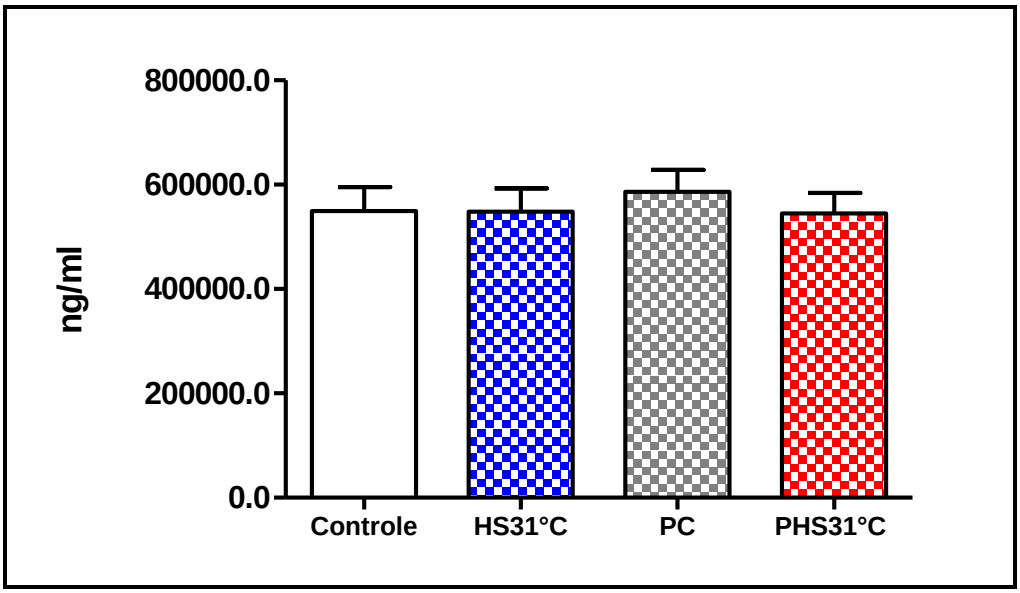
Os dados representam a média ± erro padrão. *p<0,05 em relação ao grupo Controle; #p<0,05 em relação ao grupo PC. (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls). p>0,05 para interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis* (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls)

Figura 15 – Efeitos do estresse por calor sobre os níveis plasmáticos de IgA de frangos de corte infectados ou não por Salmonella enteritidis



*p<0,05 em relação ao grupo Controle; #p<0,05 em relação ao grupo PC. (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de múltiplas comparações Newman-Keuls). p>0,05 para interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis (*ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

Figura 16 – Efeitos do estresse por calor sobre os níveis plasmáticos de IgG de frangos de corte infectados ou não por Salmonella enteritidis



Analise de variância de uma via, seguido pelo teste de múltiplas comparações Newman-Keuls (p>0,05). p>0,05 para interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis (*ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

Análise dos níveis plasmáticos de INF-γ

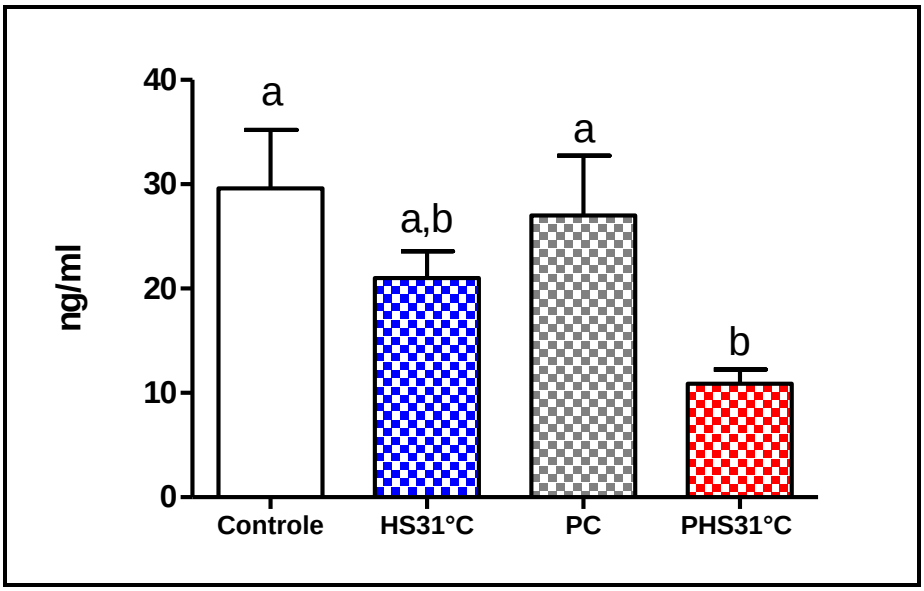
Observamos que o estresse por calor foi capaz de diminuir a concentração de IFN-γ nos frangos de corte estressados por calor e infectados com *Salmonella enteritids* (grupo PHS31°C) quando comparados aos dos grupos Controle e PC (F (3,30)=6,54; p<0,05). Não observamos presença de interações entre os fatores estresse e *Salmonella* (p>0,05). A tabela 7 mostra e a figura 17 ilustra esse resultado.

Tabela 7 – Efeitos do estresse por calor sobre os níveis plasmáticos de INF-γ de frangos de corte infectados ou não por *Salmonella enteritidis*

Parâmetro	Controle	HS31°C	PC	PHS31°C
INF-γ	29,62 ± 5,57	21,01 ± 2,56	27,02 ± 5,73	10,89 ± 2,59 #

Os dados representam a média ± erro padrão. *p<0,05 em relação ao grupo Controle; #p<0,05 em relação aos grupos Controle , PC e HS31°C. (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls). p>0,05 para interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis* (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls)

Figura 17 – Efeitos do estresse por calor sobre os níveis plasmáticos de INF-γ de frangos de corte infectados ou não por Salmonella enteritidis



Os dados estão representados em média ± SE (n=8/grupo). Letras diferentes sobre as colunas indicam diferenças estatísticas significantes (p<0.05; ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls). p>0.05 para interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis (*ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Newman-Keuls).

Análise Microbiológica do papo, ceco, fígado, baço e medula óssea

Ainda no experimento 3, realizamos análises microbiológicas do papo, ceco, fígado, baço e medula óssea dos animais infectados experimentalmente. Ao enriquecer as amostras em meio tetrationato, observamos maior número de amostras positivas para *Salmonella* no grupo PHS31°C (100% das amostras). Nos animais do grupo PC observamos apenas 50% de amostras positivas. Destaque-se, ainda, o aparecimento de positividade em amostras de medula óssea (40%) nas aves do grupo infectado e estressado por calor (PHS31°C). Os animais dos grupos Controle e HS31°C não apresentaram amostras positivas nos órgãos testados. A tabela 8 mostra esses resultados.

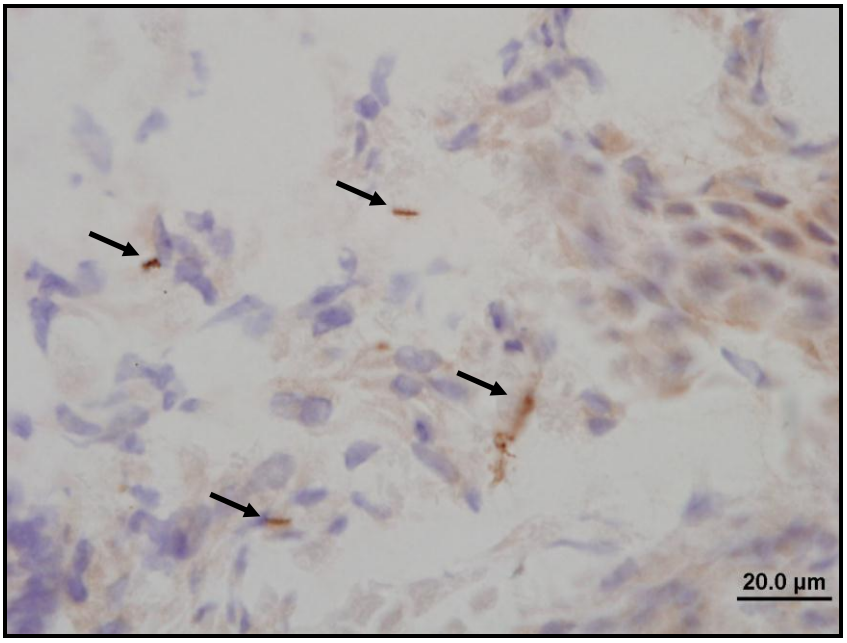
Tabela 8 – Efeitos do estresse crônico por calor de 31±1ºC sobre a colonização e a migração de *Salmonella enteritidis* para papo, ceco, fígado, baço e medula óssea em frangos de corte

Grupos	Positivos (Positivos/Total)				
	Papo	Ceco	Fígado	Baço	M.Ossea
Controle	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
HS 31°C	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
PC	5/10	0/10	0/10	5/10	0/10
PHS 31°C	6/10	5/10	2/10	5/10	4/10

As amostras foram enriquecidas em meio tetrationato para as analises de positividade. N=10 animais.

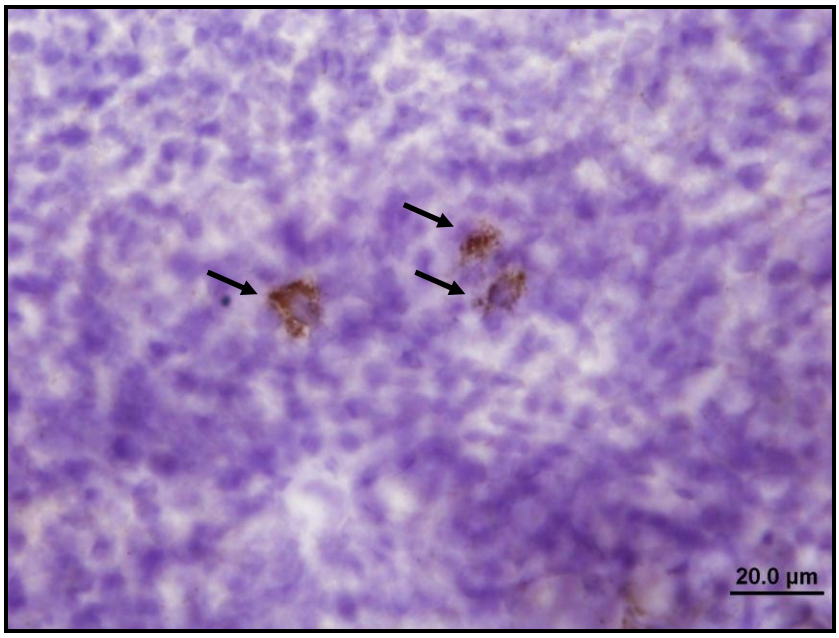
As amostras congeladas de fígado, baço e ceco foram utilizadas para padronização da técnica detecção de *Salmonella* por Imunohistoquímica, conforme descrito no item 4.12. Este procedimento identificou a presença de *Salmonella* em ceco e baço nos animais testados, mais especificamente dos animais do grupo PHS31°C. As figuras 18, 19, 20 e 21 ilustram os resultados obtidos nesta etapa.

Figura 18 – Imunohistoquimica para detecção de *Salmonella* no ceco de frangos de corte estressados por calor e infectados



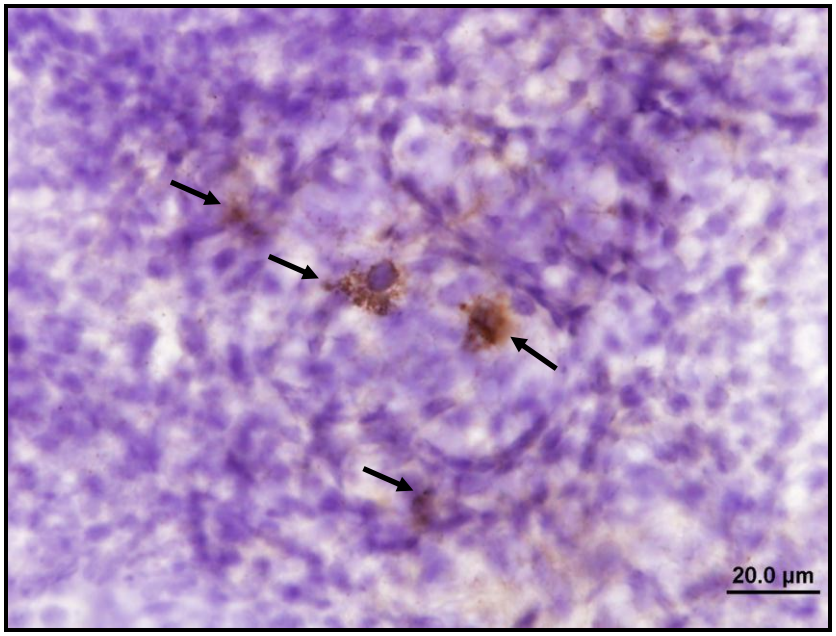
As setas mostram bactérias marcadas. Aumento de 1000X.

Figura 19 – Imunohistoquimica para detecção de *Salmonella* no baço de frangos de corte estressados por calor e infectados



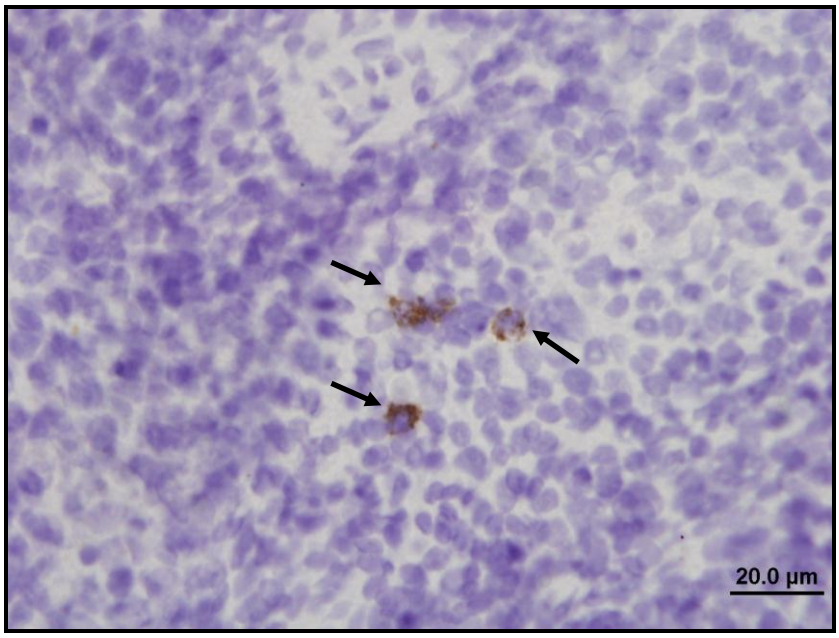
As setas mostram bactérias marcadas. Aumento de 1000X.

Figura 20 – Imunohistoquimica para detecção de *Salmonella* no baço de frangos de corte estressados por calor e infectados.



As setas mostram bactérias marcadas. Aumento de 1000X.

Figura 21 – Imunohistoquimica para detecção de *Salmonella* no baço de frangos de corte estressados por calor e infectados



As setas mostram bactérias marcadas. Aumento de 1000X.

Integridade Intestinal

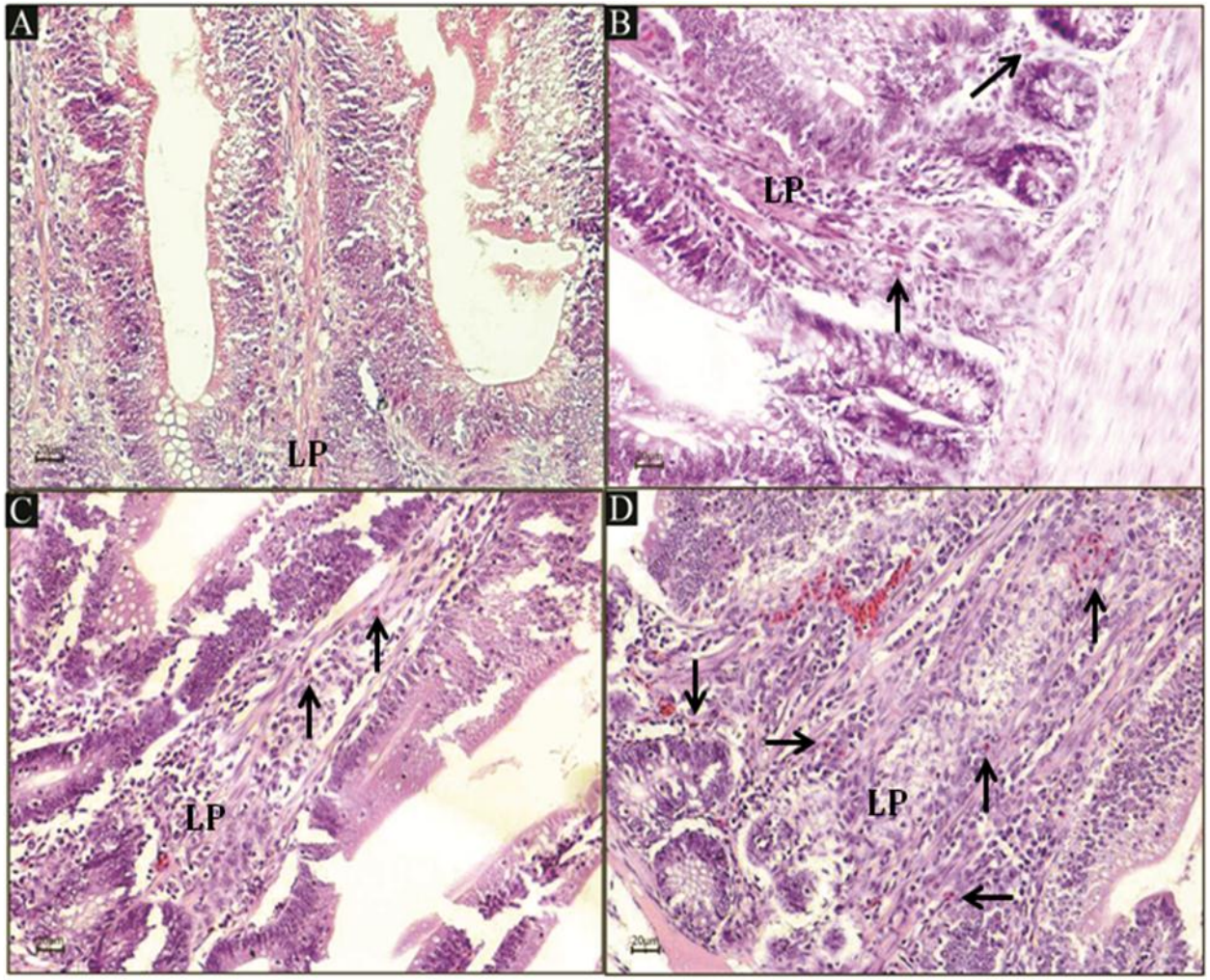
Coletamos o intestino delgado, mais especificamente o duodeno, jejuno e íleo para análise histopatológica. Nos aves do grupo PC, observamos enterite discreta em 70% das amostras (7 de 10 amostras), especificamente, observamos presença de infiltrado linfo-plasmocitico e heterófilos, tanto na lamina propria de vilo, como em região de criptas (base do vilo). Não observamos alterações microscopicas com relação à altura de vilos e conformação das criptas (Apêndice A, B e C).

Nas aves submetidas ao estresse térmico por calor (HS31°C) também foi possível observar enterite discreta nas regiões de duodeno, jejuno e íleo (70% das aves). Entretanto, no grupo PHS31°C (animais estressados e infectados), as aves apresentaram maior infiltrado inflamatório em relação àquelas dos demais grupos (80% das aves). Esta alteração foi caracterizada como sendo uma enterite moderada. De fato, observamos aumento da quantidade de infiltrado linfo-plasmocitico na lamina propria dos vilos e na região de criptas; observamos, ainda, a presença de heterófilos na região inflamada. Vale destacar que nas aves do grupo PHS31°C, observou-se que o processo inflamatório era difuso, isto é, acometia a maioria dos vilos e regiões de criptas, o que caracterizou enterite moderada. Já nos outros grupos, o processo inflamatório observado era mais focal, acometendo alguns vilos, mas manutenção de áreas intactas (enterite discreta).

Não observamos alterações microscópicas com relação à altura de vilos e conformação de criptas. As figuras 22, 23, 24, 25, 26 e 27 ilustram os resultados obtidos nesse procedimento.

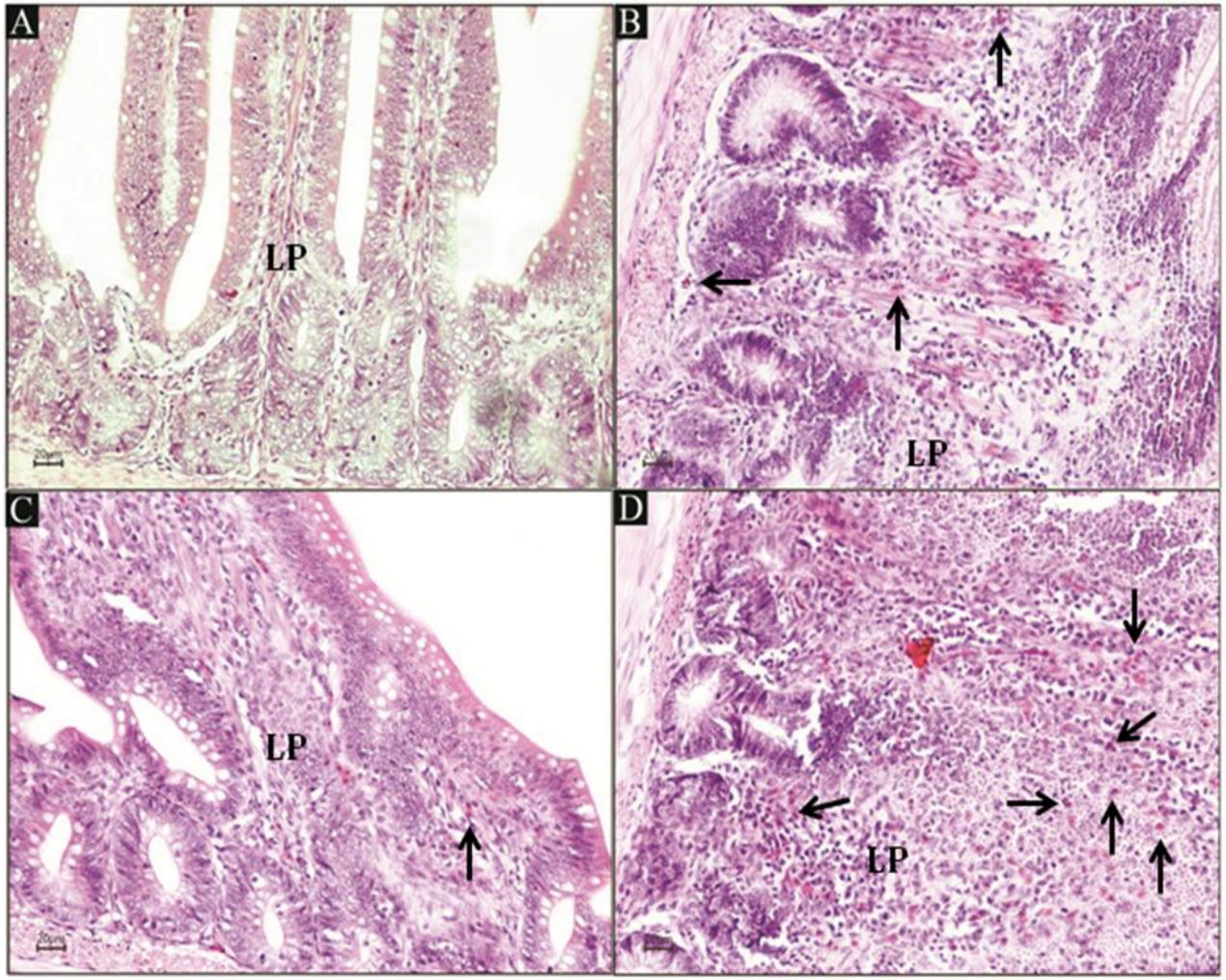
As análises da integridade intestinal foram realizadas tanto em amostras colhidas das aves do Experimento 2 como naquelas obtidas no Experimento 3, sendo que os resultados foram semelhantes.

Figura 22 – Fotomicrografia do duodeno de frangos de corte com 42 dias de vida. A) Grupo Controle; B) Grupo HS31°C; C) Grupo PC; D) Grupo PHS31°C



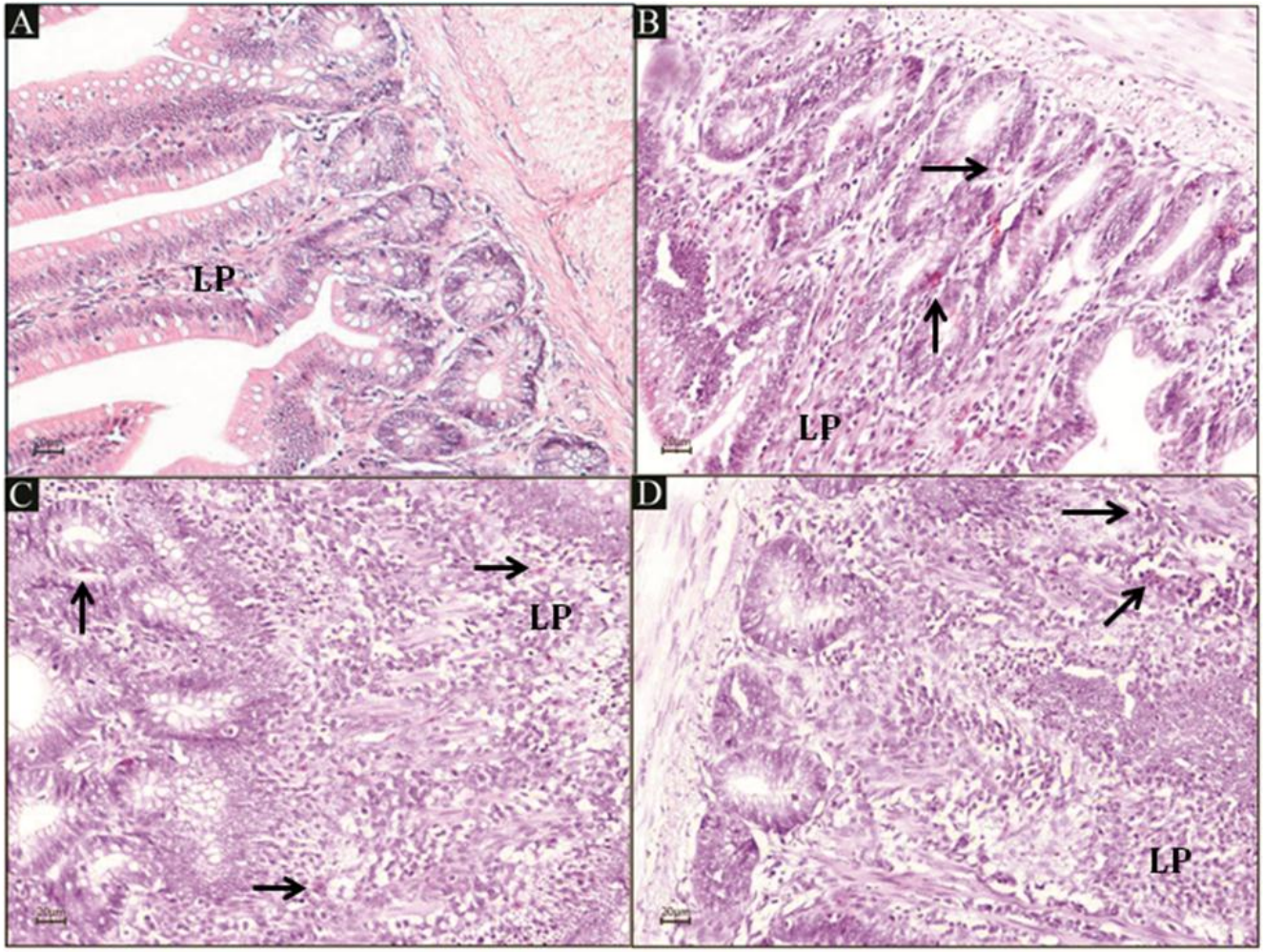
As imagens mostram região de base de vilos e criptas. Notar a presença de infiltrado linfo-plasmocitário na lamina própria (LP) nas imagens B (enterite discreta), C (enterite discreta) e D (enterite moderada). As setas indicam heterófilo na lamina própria (LP) HE, 200x.

Figura 23 – Fotomicrografia do jejuno de frangos de corte com 42 dias de vida. A) Grupo Controle; B) Grupo HS31°C; C) Grupo PC; D) Grupo PHS31°C



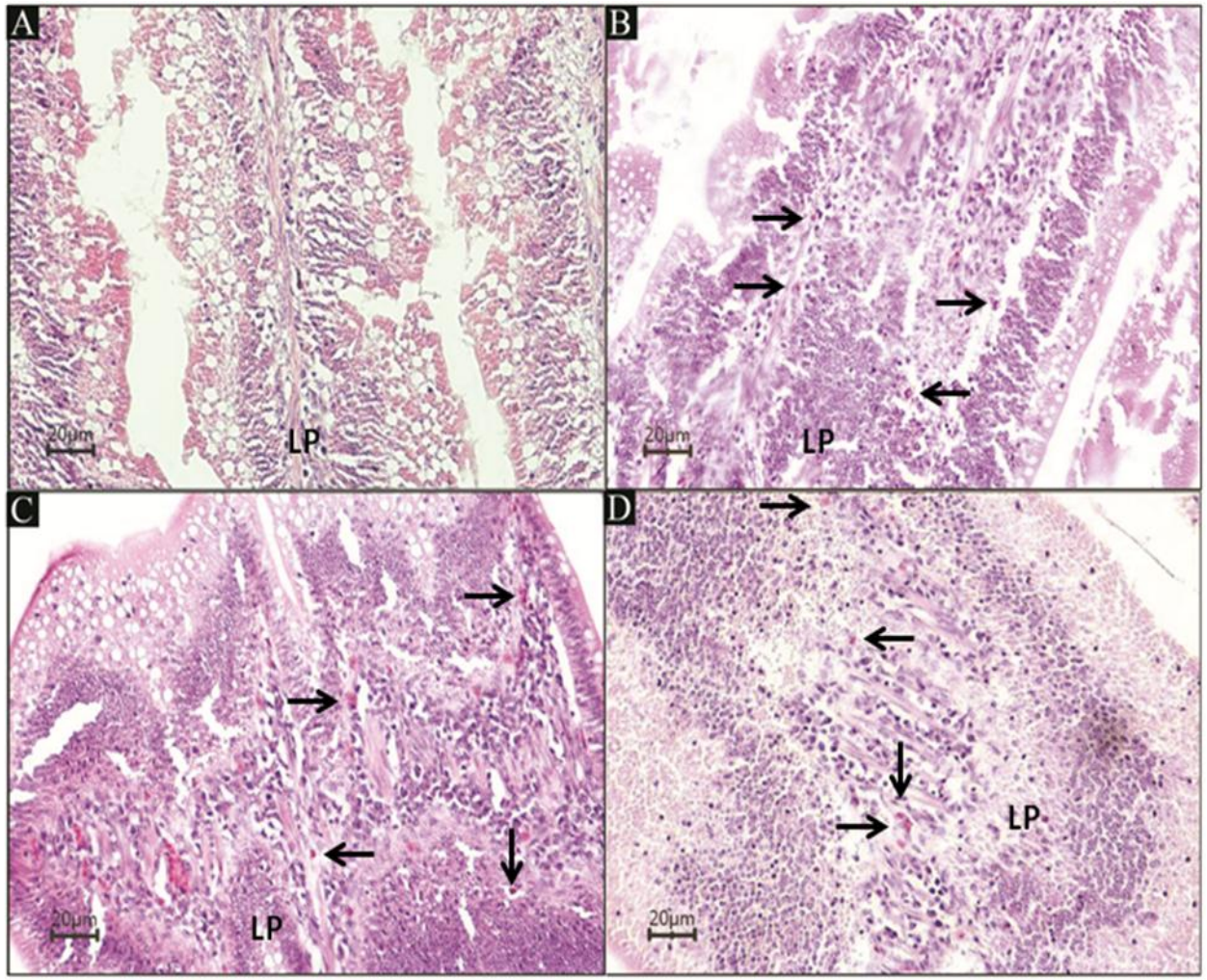
As imagens mostram região de base de vilos e criptas. Notar a presença de infiltrado linfo-plasmocitário na lamina própria (LP) nas imagens B (enterite discreta), C (enterite discreta) e D (enterite moderada). As setas indicam heterófilo na lamina própria (LP) HE, 200x.

Figura 24 – Fotomicrografia do íleo de frangos de corte com 42 dias de vida. A) Grupo Controle; B) Grupo HS31°C; C) Grupo PC; D) Grupo PHS31°C



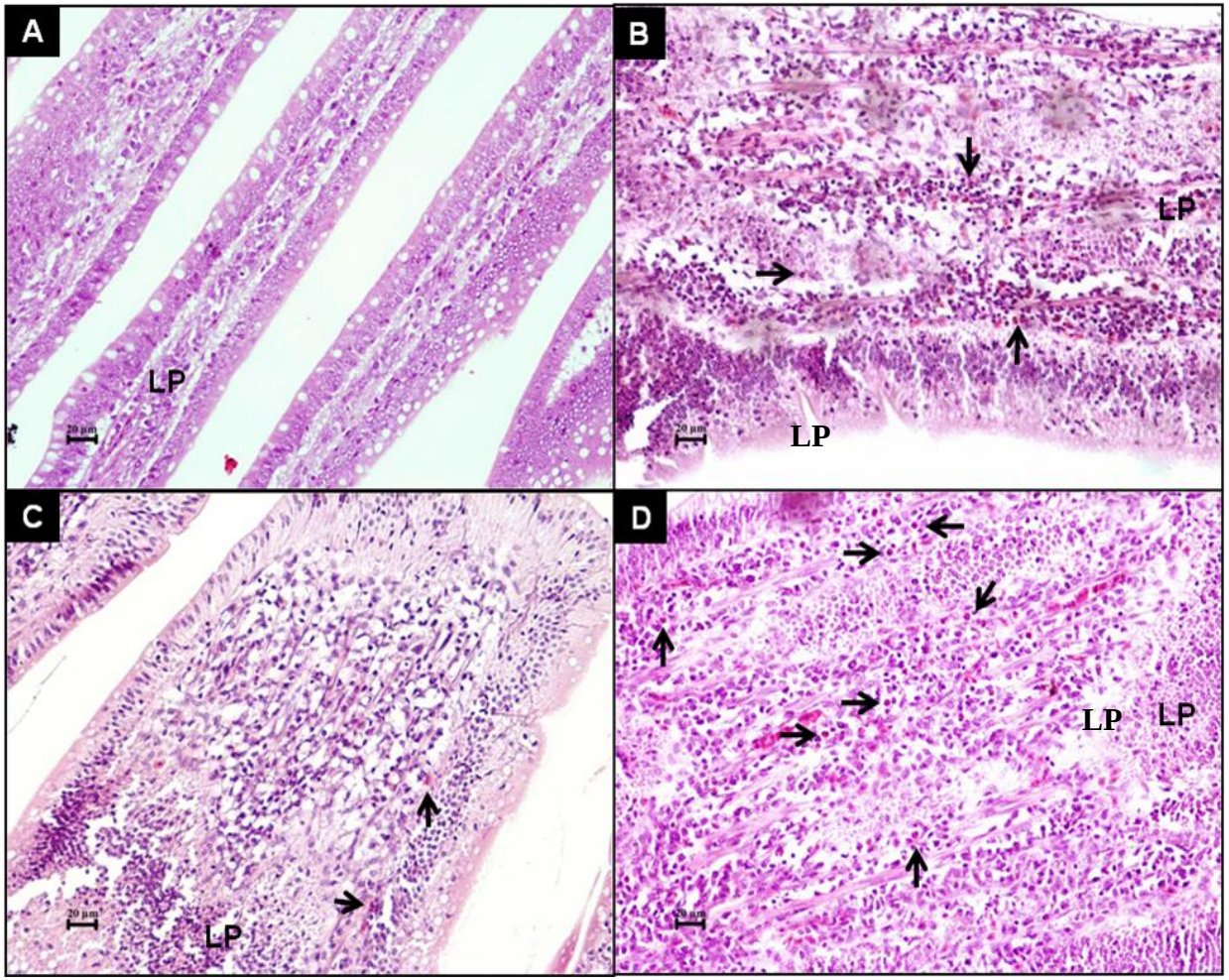
As imagens mostram região de base de vilos e criptas. Notar a presença de infiltrado linfo-plasmocitário na lamina própria (LP) nas imagens B (enterite discreta), C (enterite discreta) e D (enterite moderada). As setas indicam heterófilo na lamina própria (LP) HE, 200x.

Figura 25 – Fotomicrografia do duodeno de frangos de corte com 42 dias de vida. A) Grupo Controle; B) Grupo HS31°C; C) Grupo PC; D) Grupo PHS31°C



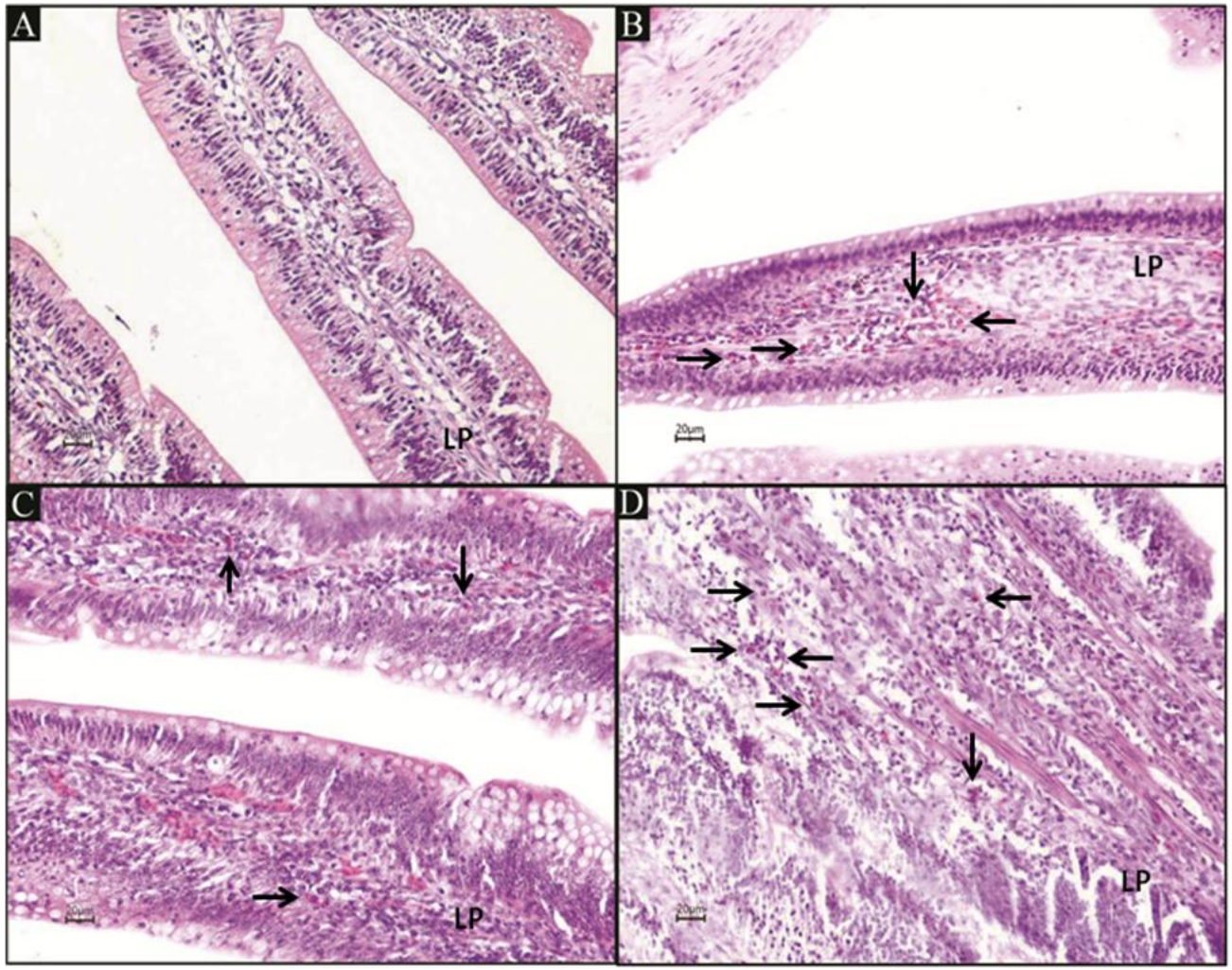
As imagens mostram região de vilos. Notar a presença de infiltrado linfo-plasmocitário na lamina própria (LP) nas imagens B (enterite discreta), C (enterite discreta) e D (enterite moderada). As setas indicam heterófilo na lamina própria (LP) HE, 200x.

Figura 26 – Fotomicrografia do jejuno de frangos de corte com 42 dias de vida. A) Grupo Controle; B) Grupo HS31°C; C) Grupo PC; D) Grupo PHS31°C



As imagens mostram região de vilos. Notar a presença de infiltrado linfo-plasmocitário na lamina própria (LP) nas imagens B (enterite discreta), C (enterite discreta) e D (enterite moderada). As setas indicam heterófilo na lamina própria (LP) HE, 200x.

Figura 27 – Fotomicrografia do íleo de frangos de corte com 42 dias de vida. A) Grupo Controle; B) Grupo HS31°C; C) Grupo PC; D) Grupo PHS31°C



As imagens mostram região de vilos. Notar a presença de infiltrado linfo-plasmocitário na lamina própria (LP) nas imagens B (enterite discreta), C (enterite discreta) e D (enterite moderada). As setas indicam heterófilo na lamina própria (LP) HE, 200x.

5.4 EXPERIMENTO 4: Avaliação da expressão de citocinas, β-defensinas aviárias (AvBD), TLR-2, TLR-4, *MyD88* e *HSP70* em frangos de cortes infectados experimentalmente com *Salmonella enteritidis*, e submetidos ou não ao estresse térmico por calor (31±1°C)

Os mesmo animais do Experimento 3 foram utilizados no Experimento 4; dessa forma, o delineamento experimental realizado no experimento anterior foi o mesmo. Entretanto, no 42° dia, após a eutanásia dos animais, foi realizada a remoção asséptica do baço e da tonsila cecal, para quantificação da expressão de RNAm de citocinas e de AVBD, TLR-2, TLR-4, *MyD88* e *HSP70*. Os órgãos foram processados, sendo realizada a extração do RNA das amostras (itens 4.10 e 4.11). Em seguida foi realizada a síntese do cDNA e, finalmente, utilizando-se a técnica de PCR em tempo real, quantificou-se a expressão dos RNAm dos genes descritos nos itens 4.10 e 4.11.

5.4.1 Resultados

Análise da expressão do RNAm de citocinas

As tabelas 9 e 10 mostram os resultados obtidos quando da análise das citocinas. Destaque-se que o estresse por calor (31±1°C) foi capaz de diminuir a expressão de IL-6 ($F(3,36)= 6,54$; $p<0,05$) e IL-12 ($F(3,36)=9,21$; $p<0,05$) no baço dos animais infectados por *Salmonella enteritidis* (grupo PH31°C). Com auxilio de teste estatístico (ANOVA de 2 vias – seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls) foi possível observar a existência de interação entre os fatores estresse por calor e infecção por *Salmonella* para IL-6 e IL-12 ($F=19,06$; $p<0,05$). Com relação às amostras de tonsila cecal, observamos que o a infecção por *Salmonella* (grupo PC) aumentou a expressão de IL-1β ($F(3,37)=8,63$; $p<0,05$) e de TGF-β

(F(3,36)= 2,65; p<0,05) dos animais do grupo PC. No caso do TGF-β, esses valores, também, mostraram-se aumentados nos animais apenas estressados por calor (F(3,36)= 2,65; p<0,05). Entretanto, quando os animais foram estressados por calor e infectados com *Salmonella* (grupo PHS31°C), as expressões dessas duas citocinas diminuíram, chegando a valores semelhantes a aqueles observados no grupo Controle, mostrando a existência de uma interação positiva entre os fatores estresse e infecção (F (3,36)=18,10; p<0,05). Com relação à IL-10 em tonsila cecal, observamos que a expressão desta citocina nos animais do grupo PC estava aumentada (F (3,38)= 3,14; p<0,05); diferentemente, quando os animais foram estressados e infectados (grupo PHS31°C), os valores obtidos foram semelhantes aos dos animais dos grupo Controle. Para as outras citocinas analisadas, não observamos diferençass estatísticas significantes (IL-8; IL-13 e IL-17). As Figuras 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 e 36 ilustram esses resultados.

Tabela 9 – Efeitos do estresse por calor sobre a expressão de citocinas em baço de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis*

Parâmetro	Controle	HS31°C	PC	PHS31°C
IL-1β	4.3E-06 ± 1.5E-06[a]	7.5E-06 ± 2.7E-06[a]	9.1E-06 ± 3.8E-06[a]	4.1E-06 ± 8.5E-07[a]
IL-6	1.8E-06 ± 3.8E-07[a]	1.4E-06 ± 3.2E-07[a]	2.1E-06 ± 5.8E-07[a]	5.7E-07 ± 1.8E-07[b]*
IL-8	6.4E-05 ± 9.5E-06[a]	8.9E-05 ± 1.6E-05[a]	6.0E-05 ± 9.8E-06[a]	7.3E-05 ± 9.4E-06[a]
IL-10	2.4E-04 ± 5.1E-05[a]	2.0E-04 ± 5.5E-05[a]	4.1E-04 ± 1.6E-04[a]	3.7E-04 ± 1.2E-04[a]
IL-12	2.4E-05 ± 3.7E-06[a]	5.4E-05 ± 1.8E-05[a]	3.0E-05 ± 3.6E-06[a]	1.1E-05 ± 3.8E-06[b]*
IL-13	6.6E-06 ± 2.2E-06[a]	4.6E-06 ± 2.2E-06[a]	2.9E-06 ± 2.0E-06[a]	9.5E-06 ± 4.7E-06[a]
IL-17	5.6E-07 ± 5.5E-07[a]	1.5E-07 ± 8.5E-08[a]	1.5E-06 ± 1.5E-06[a]	5.3E-08 ± 4.4E-08[a]
INF-γ	1.7E-04 ± 1.8E-05[a]	1.7E-04 ± 3.5E-05[a]	2.2E-04 ± 5.5E-05[a]	2.0E-04 ± 3.6E-05[a]
TGF- β	3.6E-03 ± 1.1E-03[a]	5.4E-03 ± 1.9E-03[a]	4.3E-03 ± 7.0E-04[a]	4.5E-03 ± 1.2E-03[a]

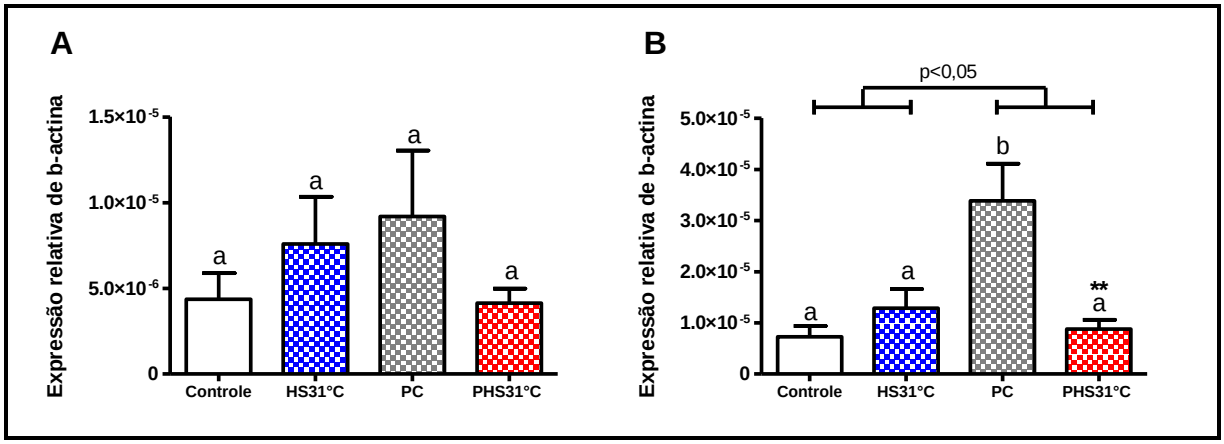
Os dados estão expressos em média ± erro padrão. Letras diferentes sobre os valore indicam diferenças estatísticas (p < 0.05, 2-way ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls). *p<0.05, indica interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis*.

Tabela 10 – Efeitos do estresse por calor sobre a expressão de citocinas em tonsila cecal de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis*

Parâmetro	Controle	HS31	PC	PHS31
IL-1β	7.2E-06 ± 2.1E-06[a]	1.3E-05 ± 3.8E-06[a]	3.4E-05 ± 7.2E-06[b]	8.8E-06 ± 1.8E-06[a]*
IL-6	1.4E-06 ± 2.3E-07[a]	2.1E-06 ± 7.9E-07[a]	2.3E-06 ± 3.4E-07[a]	2.7E-06 ± 1.0E-06[a]
IL-8	6.3E-05 ± 1.2E-05[a]	5.3E-05 ± 1.1E-05[a]	4.0E-05 ± 1.0E-05[a]	6.7E-05 ± 7.8E-06[a]
IL-10	5.0E-04 ± 5.4E-05[a]	5.9E-04 ± 9.1E-05[a]	1.1E-03 ± 2.8E-04[b]	7.1E-04 ± 8.1E-05[a]
IL-12	7.2E-06 ± 4.1E-06[a]	6.2E-06 ± 1.9E-06[a]	1.0E-05 ± 3.2E-06[a]	9.5E-06 ± 2.7E-06[a]
IL-13	1.8E-05 ± 5.5E-06[a]	2.8E-05 ± 9.5E-06[a]	2.0E-05 ± 7.3E-06[a]	1.4E-05 ± 2.6E-06[a]
IL-17	1.7E-06 ± 4.4E-07[a]	2.6E-06 ± 1.0E-06[a]	2.4E-06 ± 1.0E-06[a]	1.5E-06 ± 3.4E-07[a]
INF-γ	1.4E-04 ± 2.2E-05[a]	1.3E-04 ± 8.8E-06[a]	1.3E-04 ± 2.3E-05[a]	2.2E-04 ± 3.8E-05[a]
TGF- β	4.3E-04 ± 9.0E-05[a]	2.1E-03 ± 9.2E-04[b]	2.1E-03 ± 4.9E-04[b]	6.9E-04 ± 1.7E-04[a]*

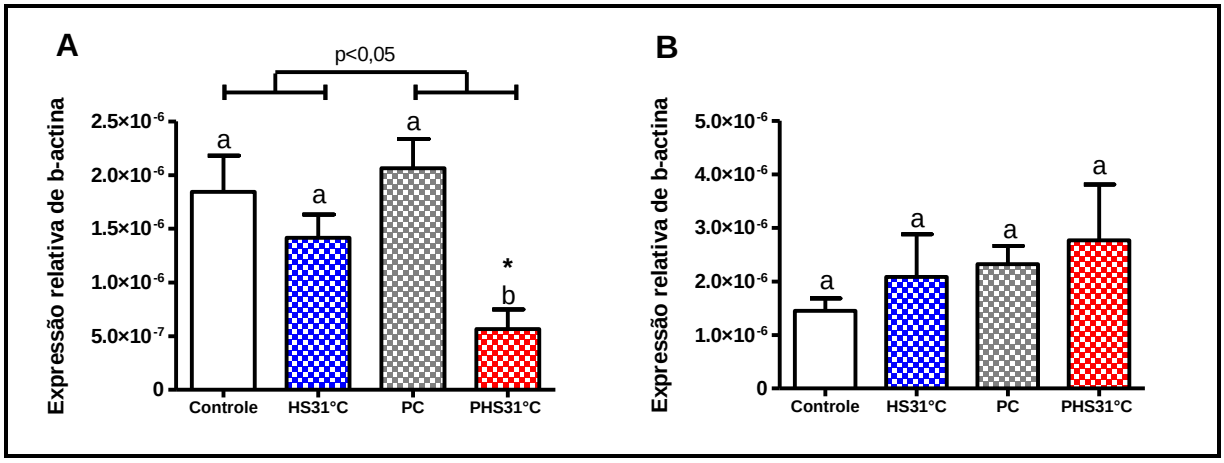
Dados estão expressos em média ± erro padrão. Letras diferentes sobre os valore indicam diferenças estatísticas ($p < 0.05$, 2-way ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).*$p<0.05$, indica interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis*.

Figura 28 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a expressão gênica de IL1-β (expressão relativa de β-actina) em baço (A) e tonsila cecal (B) de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis*



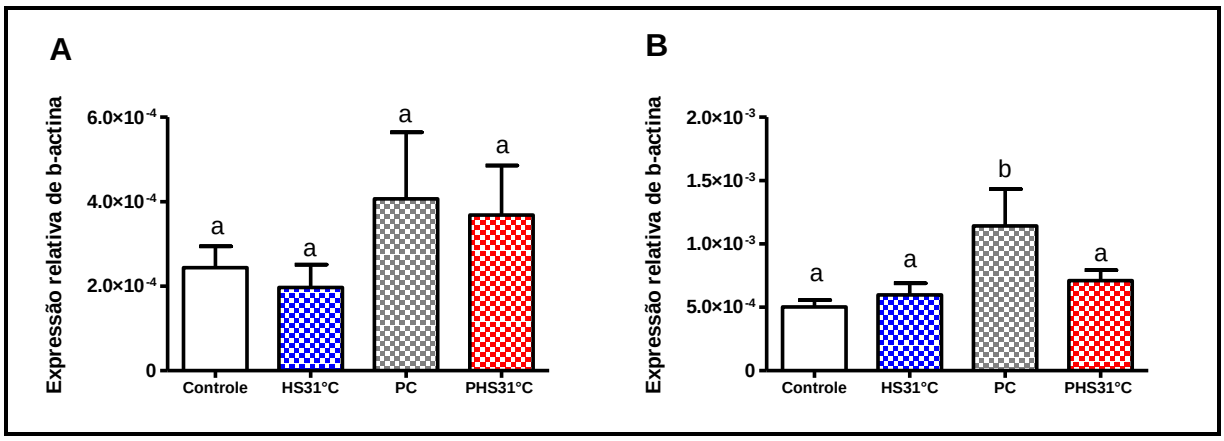
Os dados estão representados em média ± SE (n=10/grupo). Letras diferentes sobre as colunas indicam diferenças estatísticas significantes ($p < 0.05$; ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls). **$p<0.01$, indica interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis (*ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Newman-Keuls).

Figura 29 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a expressão gênica de IL-6 (expressão relativa de β-actina) em baço (A) de frangos (B) de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis*



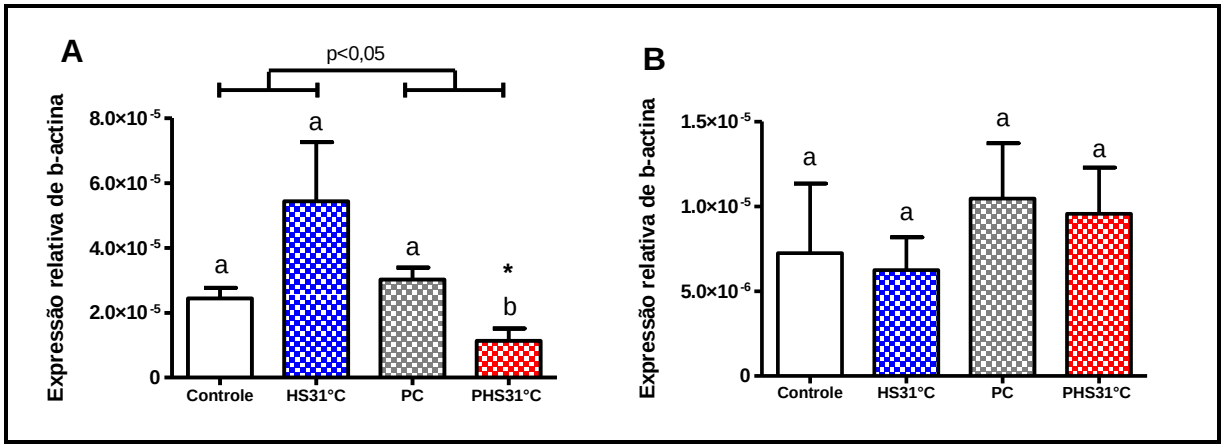
Os dados estão representados em média ± SE (n=10/grupo). Letras diferentes sobre as colunas indicam diferenças estatísticas significantes (p<0,.05; ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls). *p<0.05, indica interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis (*ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

Figura 30 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a expressão gênica de IL-10 (expressão relativa de b-actina) em baço (A) e tonsila cecal (B) de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis*



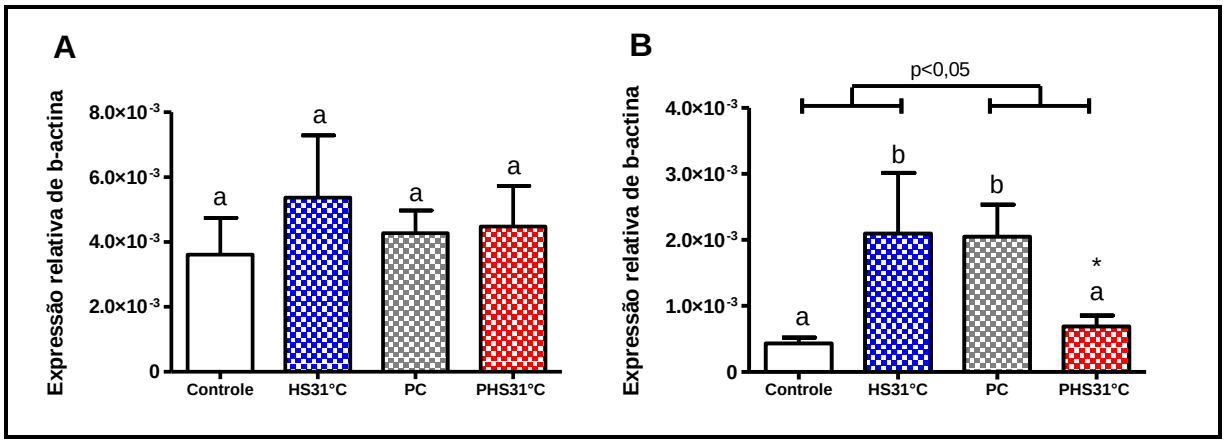
Os dados estão representados em média ± SE (n=10/grupo). Letras diferentes sobre as colunas indicam diferenças estatísticas significantes (p<0,05; ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls). P>0.05 para interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis (*ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

Figura 31 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a expressão gênica de IL-12 (expressão relativa de β-actina) em baço (A) e tonsila cecal (B) de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis*



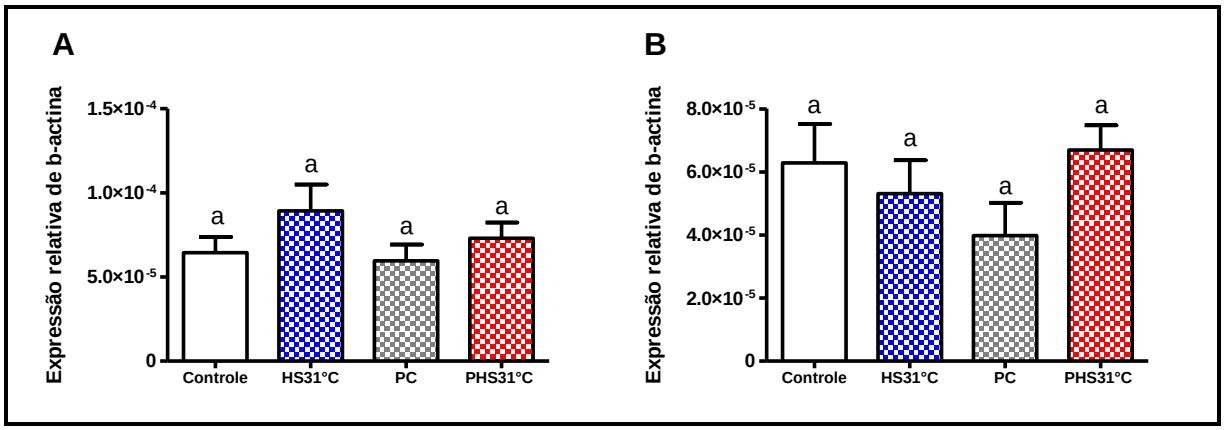
Os dados estão representados em média ± SE (n=10/grupo). Letras diferentes sobre as colunas indicam diferenças estatísticas significantes (p<0,05; ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls). *p<0.05, indica interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis (*ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

Figura 32 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a expressão gênica de TGF-b (expressão relativa de b-actina) em baço (A) e tonsila cecal (B) de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis*



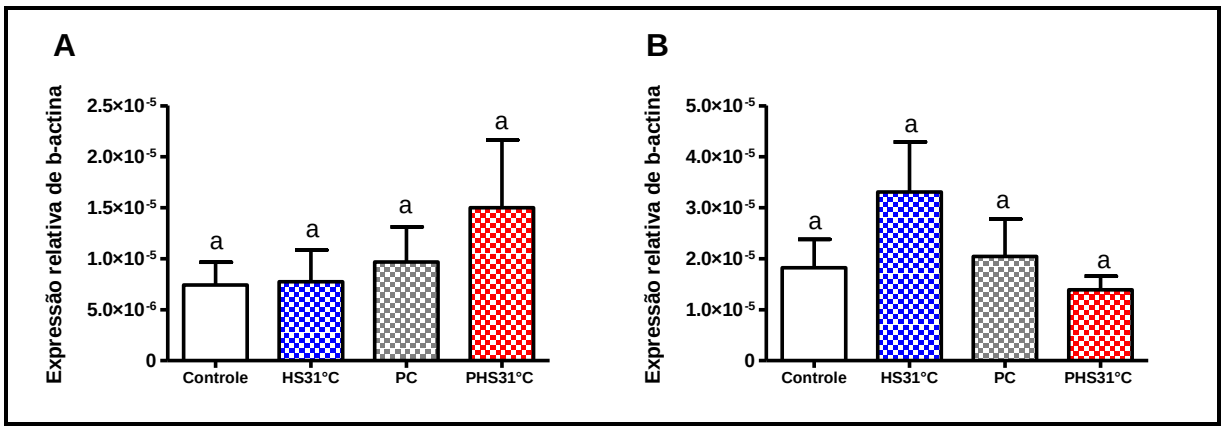
Os dados estão representados em média ± SE (n=10/grupo). Letras diferentes sobre as colunas indicam diferenças estatísticas significantes (p<0.05, ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls). *P<0.05 para interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis (*ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls)

Figura 33 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a expressão gênica de IL-8 (expressão relativa de b-actina) em baço (A) e tonsila cecal (B) de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis*



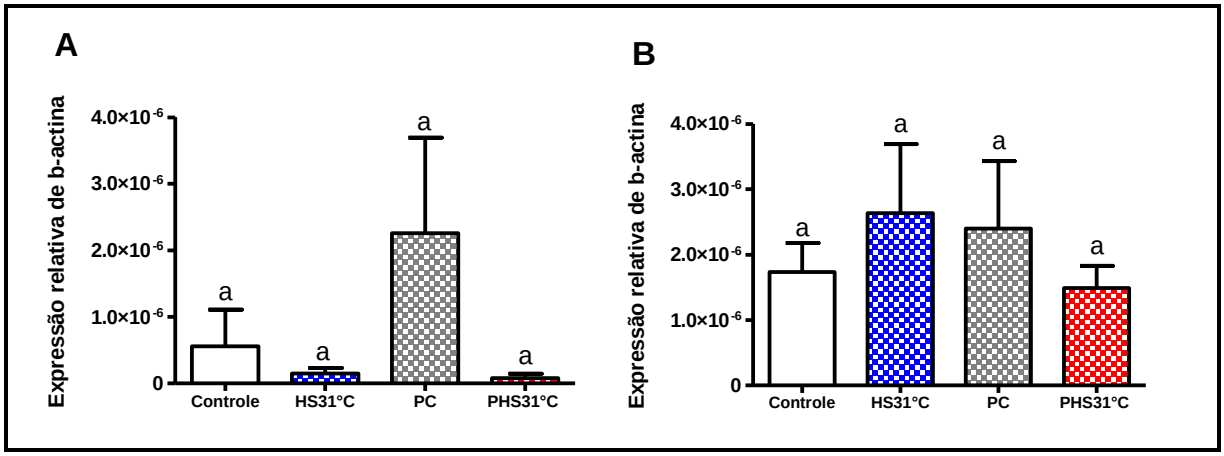
Os dados estão representados em média ± SE (n=10/grupo). Letras diferentes sobre as colunas indicam diferenças estatísticas significantes (p>0,05; ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls). p>0.05 para interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis (*ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

Figura 34 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C)sobre a expressão gênica de IL-13 (expressão relativa de b-actina) em baço (A) e tonsila cecal (B) de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis*



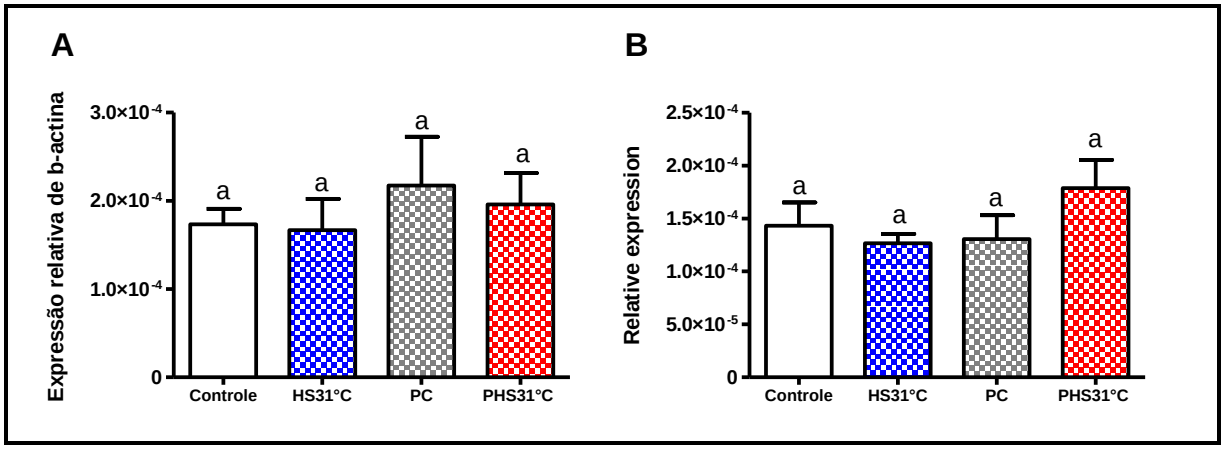
Os dados estão representados em média ± SE (n=10/grupo). Letras diferentes sobre as colunas indicam diferenças estatísticas significantes (p>0.05, ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls). p>0.05 para interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis (*ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

Figura 35 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a expressão gênica de IL-17 (expressão relativa de b-actina) em baço (A) e tonsila cecal (B) de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis*



Os dados estão representados em média ± SE (n=10/grupo). Letras diferentes sobre as colunas indicam diferenças estatísticas significantes (p>0.05, ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls). p>0.05 para interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis (*ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

Figura 36 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a expressão gênica de INF-γ (expressão relativa de b-actina) em baço (A) e tonsila cecal (B) de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis*



Os dados estão representados em média ± SE (n=10/grupo). Letras diferentes sobre as colunas indicam diferenças estatísticas significantes (p>0.05; ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls). p>0.05 para interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis (*ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

Beta-Defesinas (AvBD)

Analisando-se quatro diferentes β-defensinas aviárias: AvBD-1, AvBD-2, AvBD-4 e AvBD-6 observamos que tanto o estresse por calor (grupo HS31°C) como a infecção por *Salmonella* (grupo PC) foram capazes de aumentar a expressão de AvBD-4 ($F(3,39)=3,75$; $p<0.05$) e AvBD-6 ($F(3,34)=3,89$; $p<0.05$) na tonsila cecal dos frangos (grupo HS31°C). Entretanto, as expressões dessas duas defensinas diminuíram a valores semelhantes aos observados no grupo controle quando os animais foram estressados por calor e infectados com *Salmonella enteritidis* (grupo PHS31) mostrando este fato a existência de uma interação entre o estresse e a infecção ($F(3,39)=10,16$; $p<0.05$, ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls). Com relação a AvBD-1, AvBD-2 não observamos diferenças estatísticas para elas entre os animais dos diferentes grupos ($p>0.05$). As Tabelas 11 e 12 mostram e as figuras 37 e 38 ilustram esses resultados.

Tabela 11 – Efeitos do estresse por calor sobre a expressão de AvBD-1, AvBD-2, AvBD-4 e AvBD-6 em baço de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis*

Parâmetro	Controle	HS31°C	PC	PHS31°C
AvBD-1	3.3E-04 ± 1.6E-04[a]	1.8E-04 ± 4.9E-05[a]	8.7E-05 ± 4.8E-05[a]	8.8E-05 ± 3.5E-05[a]
AvBD-2	1.3E-04 ± 2.4E-05[a]	1.5E-04 ± 6.0E-05[a]	5.1E-05 ± 2.6E-05[a]	5.5E-05 ± 2.5E-05[a]
AvBD-4	6.7E-05 ± 1.7E-05[a]	1.2E-04 ± 3.6E-05[a]	7.0E-05 ± 3.0E-05[a]	7.2E-05 ± 1.6E-05[a]
AvBD-6	1.7E-03 ± 7.5E-04[a]	1.5E-03 ± 4.7E-04[a]	3.8E-04 ± 2.2E-04[a]	6.1E-04 ± 2.4E-04[a]

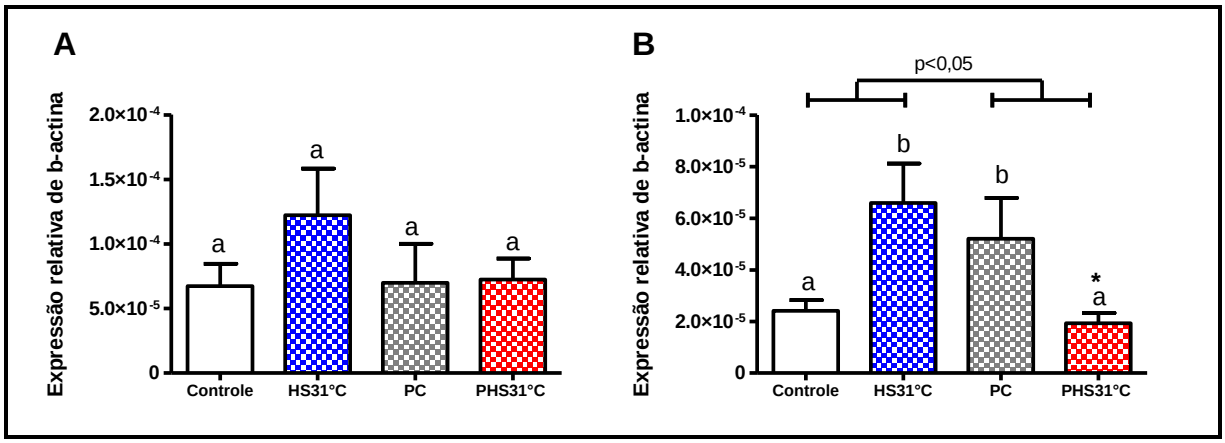
Dados estão expressos em média ± erro padrão. Letras diferentes sobre os valore indicam diferenças estatísticas ($p>0,05$; ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls). $p>0.05$ para interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis*. (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

Tabela 12 – Tabela X: Efeitos do estresse por calor sobre a expressão de AvBD-1, AvBD-2, AvBD-4 e AvBD-6 em tonsila cecal de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis*

Parâmetro	Controle	HS31°C	PC	PHS31°C
AvBD-1	3.9E-04 ± 7.9E-05[a]	5.5E-04 ± 1.7E-04[a]	4.8E-04 ± 1.6E-04[a]	2.7E-04 ± 8.1E-05[a]
AvBD-2	2.4E-04 ± 3.7E-05[a]	3.2E-04 ± 1.0E-04[a]	3.9E-04 ± 1.5E-04[a]	1.6E-04 ± 4.7E-05[a]
AvBD-4	2.4E-05 ± 4.2E-06[a]	6.6E-05 ± 1.5E-05[b]	5.2E-05 ± 1.6E-05[b]	1.9E-05 ± 4.0E-06[a]*
AvBD-6	2.1E-03 ± 3.9E-04[a]	5.8E-03 ± 1.8E-03[b]	5.1E-03 ± 1.5E-03[b]	1.6E-03 ± 4.9E-04[a]*

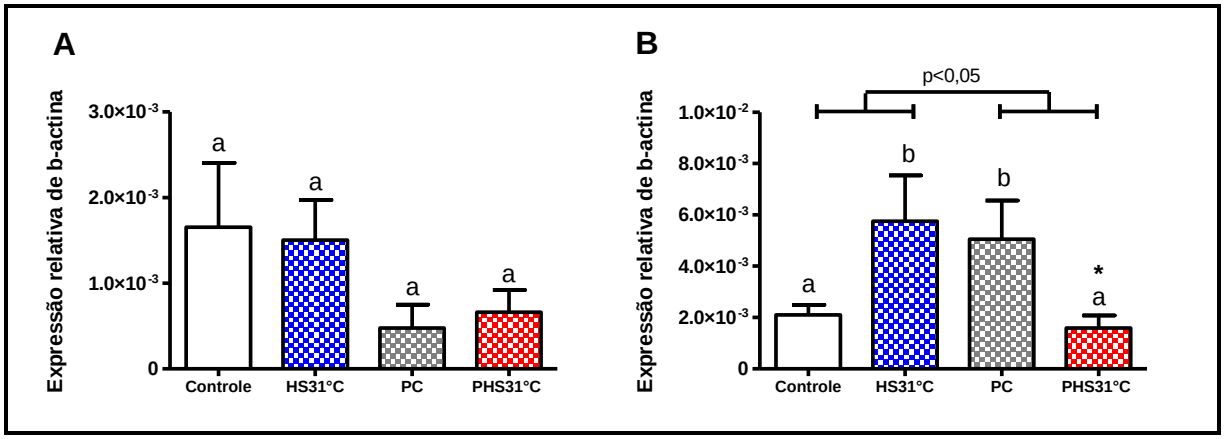
Dados estão expressos em média ± erro padrão. Letras diferentes sobre os valore indicam diferenças estatísticas (p<0,05; ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls). *p<0.05, indica interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis*. (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

Figura 37 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a expressão gênica de AvBD-4 (expressão relativa de b-actina) em baço (A) e tonsila cecal (B) de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis*



Os dados estão representados em média ± SE (n=10/grupo). Letras diferentes sobre as colunas indicam diferenças estatísticas significantes (p<0.05, ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls). *p<0.05 para interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis (*ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

Figura 38 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a expressão gênica de AvBD-6 (expressão relativa de b-actina) em baço (A) e tonsila cecal (B) de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis*



Os dados estão representados em média ± SE (n=10/grupo). Letras diferentes sobre as colunas indicam diferenças estatísticas significantes ($p<0.05$, ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls). *$p<0.05$ para interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis (*ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

TLR-2, TLR-4 e *MyD88*

Não observamos diferenças estatísticas entre os grupos quanto à expressão de TLR-4 e *MyD88* em baço e tonsila cecal. Entretanto, ao análisar a expressão de TLR-2 (ANOVA de 2 vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls), observamos existência de interação ($F(3,36)=27,72$;$p<0.05$) entre os fatores estresse por calor e infecção por *Salmonella enteritidis* tanto em baço como em tonsila cecal. Especificamente, observamos que a infecção por *Salmonella enteritidis* (grupo PC) aumentou a expressão de TLR-2 nos dois órgãos (baço: $F(3,36)=3,42$; $p<0,05$; tonsila: $F(3,36)=4,96$); porém, quando juntos, o estresse por calo e a infecção, os valores mostram-se reduzidos. As tabelas 13 e 14 mostraram e as figuras 39 e 40 ilustram esses resultados.

Tabela 13 – Efeitos do estresse por calor sobre a expressão gênica de TLR-2, TLR-4 e *MyD88* em baço de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis*

Parâmetros	Controle	HS31°C	PC	PHS31°C
TLR-2	2.47± 0.33[a]	4.85± 1.81[a,b]	7.23± 1.54[b]	2.74 0.37[a]*
TLR-4	0.74 ±0.08[a]	1.13± 0.33[a]	0.96 ±0.13[a]	0.80±0.16[a]
MyD88	4.1E-04±1.0E-04[a]	5.5E-04±1.1E-04[a]	2.9E-04±6.1E-05[a]	3.6E-04±5.8E-05[a]

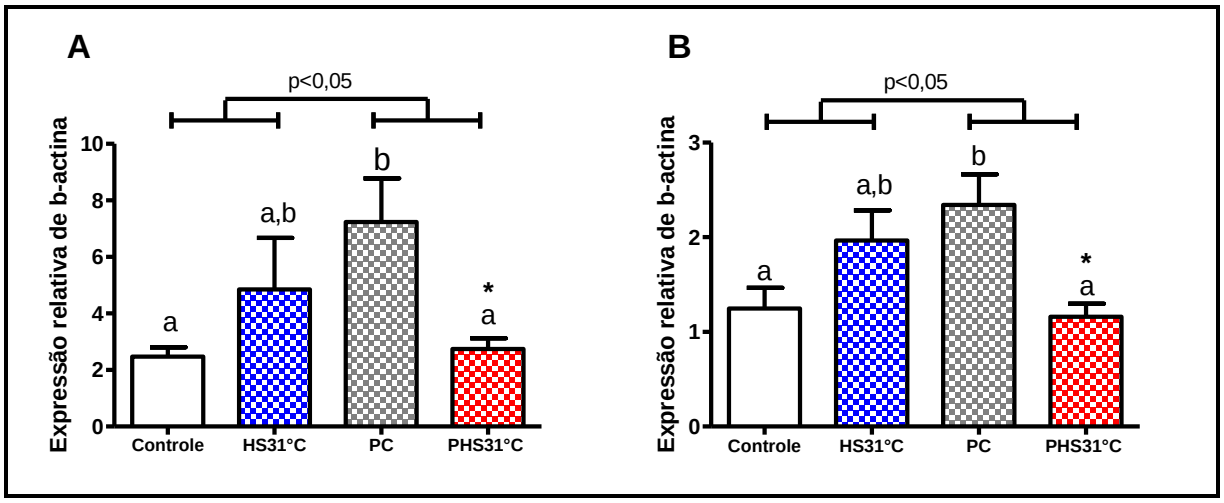
Dados estão expressos em média ± erro padrão. Letras diferentes sobre os valore indicam diferenças estatísticas (p<0,05; ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls). *p<0.05, indica interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis* (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

Tabela 14 – Efeitos do estresse por calor sobre a expressão gênica de TLR-2, TLR-4 e MyD88 em tonsila cecal de frangos de corte infectados com *Salmonella enteritidis*

Parâmetros	Controle	HS31°C	PC	PHS31°C
TLR-2	1.24±0.21[a]	1.96± 0.31[a,b]	2.34± 0.32b	1.15± 0.14[a]*
TLR-4	0.34 ±0.01[a]	0.50 ±0.05[a]	0.44 ±0.04[a]	0.40 ±0.04[a]
MyD88	1.9E-04±2.5E-05[a]	2.4E-04±7.7E-05[a]	2.2E-04±4.2E-05[a]	2.1E-04±3.1E-05[a]

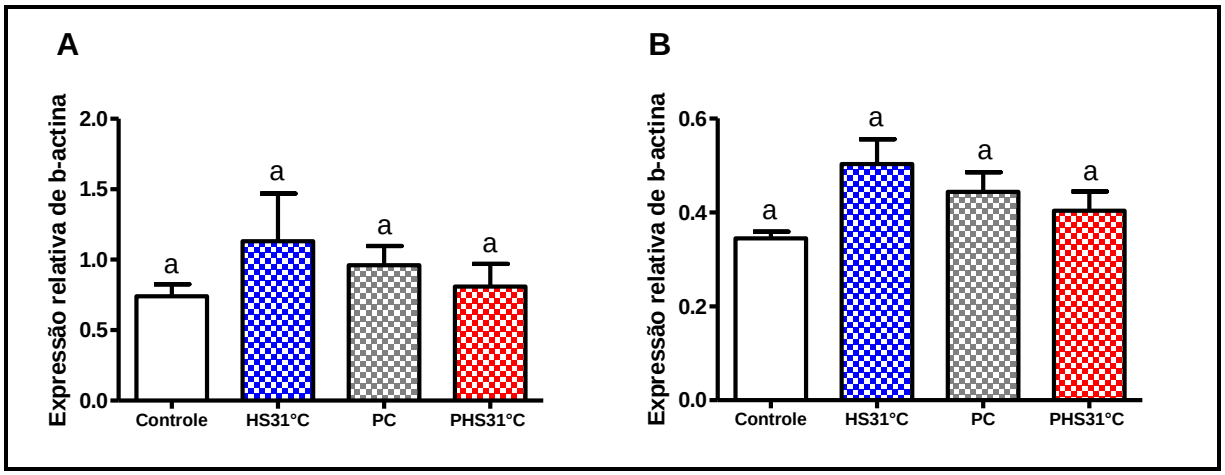
Dados estão expressos em média ± erro padrão. Letras diferentes sobre os valore indicam diferenças estatísticas (p<0,05; ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls). *p<0.05, indica interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis* (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls)

Figura 39 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a expressão gênica de TLR-2 (expressão relativa de β-actina) em baço (A) e tonsila cecal (B) de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis*



Os dados estão representados em média ± SE (n=10/grupo). Letras diferentes sobre as colunas indicam diferenças estatísticas significantes (p < 0,05, ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls). *p<0,05 para interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis (*ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Newman-Keuls).

Figura 40 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a expressão gênica de TLR-4 (expressão relativa de b-actina) em baço (A) e tonsila cecal (B) de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis*



Os dados estão representados em média ± SE (n=10/grupo). Letras diferentes sobre as colunas indicam diferenças estatísticas significantes (p > 0,05, ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls). p>0,05 para interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis (*ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Newman-Keuls).

Heat-Shock Protein 70 (*HSP70*)

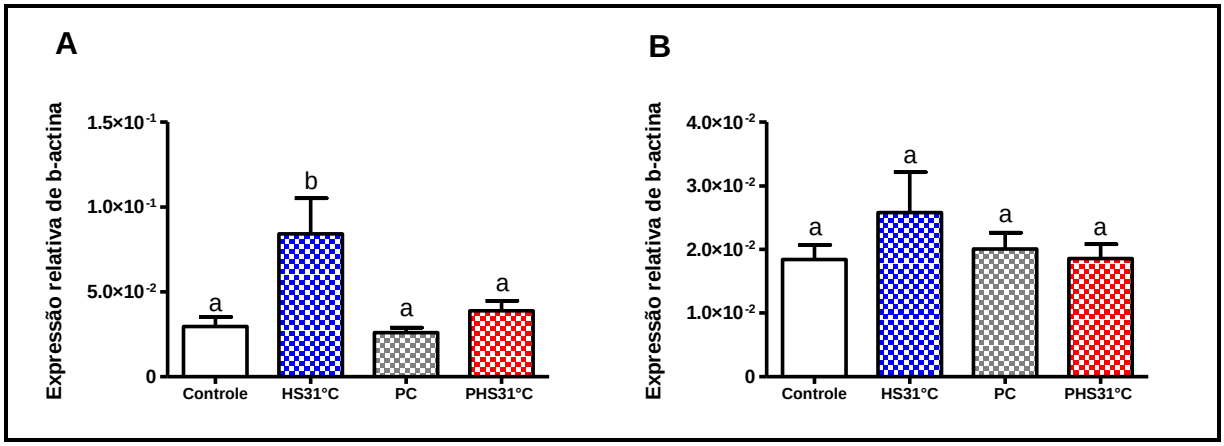
A tabela 15 mostra e a figura 41 ilustra que o estresse por calor (grupo HS31°C) aumentou a expressão gênica de *HSP70* em baço, quando comparado aos dados observados no grupo controle (F (3,34)=5,08; p<0,05). Nos animais do grupo PHS31°C, observamos que os valores obtidos assemelham-se àqueles do grupo controle e PC (p>0,05). Em tonsila cecal, não observamos diferenças estatísticas quanto à expressão gênica dessa proteína. Também, não observamos interação entre estresse por calor e infecção por S*almonella enteritidis* em ambos os órgãos analisados (p>0,05).

Tabela 15 – Efeitos do estresse por calor sobre a expressão gênica de *HSP70* em tonsila cecal de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis*

Parâmetro	Controle	HS31°C	PC	PHS31°C
HSP70 baço	0.02±0.004[a]	0.08±0.02[b]	0.02±0.003[a]	0.03±0.005[a,b]
HSP70 tonsila cecal	0.01±0.002[a]	0.02±0.006[a]	0.02±0.002[a]	0.018±0.002[a]

Dados estão expressos em média ± erro padrão. Letras diferentes sobre os valore indicam diferenças estatísticas (p<0.05, ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls); p>0.05, não observamos interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis* (p>0.05, ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

Figura 41 – Efeitos do estresse por calor (31 ± 1 °C) sobre a expressão gênica de *HSP70* (expressão relativa de b-actina) em baço (A) e tonsila cecal (B) de frangos de corte infectados ou não com *Salmonella enteritidis*



Os dados estão representados em média ± SE (n=10/grupo). Letras diferentes sobre as colunas indicam diferenças estatísticas significantes ($p < 0.05$, ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls). $p>0,05$ para interação entre o estresse por calor e a infecção por *Salmonella enteritidis (*ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls).

7 DISCUSSÃO

O estresse vem sendo destacado como um dos grandes males da sociedade moderna. Inúmeros estudos vêm demostrado que situações estressoras acarretam imunossupressão e aumento de susceptibilidade às doenças, como por exemplo, a processos infecciosos, tumorais e doenças auto-imune (PALERMO-NETO; DE OLIVEIRA MASSOCO; ROBESPIERRE DE SOUZA, 2003; COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010; DIMITRIJEVIC et al., 2012; TAVANO et al., 2012). Cientistas de todo o mundo são unânimes ao destacar a relevância das relações entre os sistemas nervoso, endócrino e imune para explicar os efeitos do estresse em mamiferos; entretanto, o estudo dessas interações em aves vem ganhando força apenas nos últimos 5 anos. Nossos resultados dão continuidade à linha de pesquisa em neuroimunomodulação em aves. Especificamente, observamos que o estresse por calor (31±1°C, 10h/dia por 6 dias) aplicado em frangos de corte desafiados com *Salmonella enteritidis*: 1) diminuiu os índices zootécnicos (ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar); 2) aumentou os níveis séricos de corticosterona; 3) diminuiu os níveis plasmáticos de IgA; 4) diminuiu os níveis plasmáticos de INF-γ; 5) diminuiu a expressão de algumas citocinas, dentre elas IL-1β; IL-6; IL-10; IL-12 e TGF-β; 5) diminuiu a expressão de AvBD-4 e AvBD-6; 7) diminuiu a expressão de TLR-2; 8) induziu enterite moderada no intestino delgado das aves, isto é, lesões difusas e constantes na mucosa do duodeno, jejuno e íleo com aumento de infiltrado linfo-plasmocitico e presença de heterófilos; e finalmente, observamos, ainda que o estresse por calor, 9) aumentou a migração de *Salmonella enteritidis* da luz intestinal para o baço das aves do grupo PHS31°C, além de permitir o aparecimento de *Salmonella* na medula óssea das aves.

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, pelas habilidades que têm o sistema imune de produzir neurotransmissores e neuropeptídeos comumente encontrados no SNC e o Sistema Nervoso Central de produzir citocinas e mediadores de processos imune/inflamatórios (GANEA, 1996; GARZA; CARR, 1997; REUL et al., 1998).

O eixo HPA é um dos mais importantes sistemas a integrar as respostas de um organismo quando algum estimulo estressor, ameaça sua homeostase (MCEWEN, 2000).

Como resultado, observa-se aumento dos níveis de cortisol/corticosterona e de outros hormônios que, se mantidos elevados e, em especial, por longos períodos de tempo prejudicam a saúde dos animais (ELENKOV et al., 2000; ALVES; PALERMO-NETO, 2007; COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010; QUINTEIRO-FILHO et al., 2010; ALVES; RIBEIRO; PALERMO-NETO, 2011). 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 exercido pelo eixo HPA é o Hormônio Liberador de Corticotropina (CRH). O produto final imunomodulador desta cascata é o cortisol em humanos e hamsters e a corticosterona em outros roedores e em aves (LAWRENCE; KIM, 2000). Esses glicocorticóides, sabidamente regulam os processos inflamatórios/imunológicos (MCEWEN et al., 1997). Neste sentido, mostrou-se a ativação do eixo HPA por agentes liberados internamente como IL-1 (DUNN, 1995.; DEL REY et al., 1996; BESEDOVSKY; DEL REY, 2010) ou externos como estresse térmico em animais de produção (ZULKIFLI 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); a consequente liberação de ACTH e de glicocorticóides modula as respostas neurovegetativas ligadas às situações de estresse e de ansiedade (GRAEFF; HUNZIKER; GRAEFF, 1989; BESEDOVSKY; REY, 2007; COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010).

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 achados mostram aumento dos níveis de corticosterona em aves estressadas por calor; corroboram, portanto, com dados de nossos trabalhos anteriores, visto que observamos que diferentes intensidades de estresse por calor aumentaram os níveis de corticosterona sérica (QUINTEIRO-FILHO et al., 2010) (ANEXO A). Observamos, também, que um estresse agudo por calor de 31°C também aumentou os níveis de corticosterona de frangos de corte (QUINTEIRO-FILHO et al., 2012b) (ANEXO B). Em especial, Quinteiro-Filho et. al (2012b) mostraram que 10h após o inicio do estresse agudo, os níveis de corticosterona aumentaram, regredindo a níveis basais quando o estimulo estressor foi interrompido. Porém, quando mantivemos o estresse por calor por um período mais longo (10h/dia – 6 dias), observamos que os níveis de corticosterona permaneceram elevados, mesmo após a interrupção do estimulo estressor (ANEXOS A E C). Observamos, ainda no

presente trabalho que o estresse por calor aumentou os níveis séricos de corticosterona nos frangos de corte infectados com *Salmonella*.

Alguns pesquisadores sugeriram a participação direta do estresse por calor em genes presentes em regiões do hipotálamo associadas ao apetite de galinhas poedeiras (como, por exemplo, transcritos regulados pela *ghrelin*, ou pela cocaína, anfetamina e colecistoquinina), modulando, desta forma, a ingestão de alimentos e, consequentemente, o ganho de peso (SONG et al., 2012). Nossos dados não descartam a idéia de que a diminuição do desempenho das aves estressadas possa ser consequência de um mecanismo direto do estresse por calor no SNC das aves; no entanto, esta perda de desempenho pode estar também e, de alguma forma, relacionada com alterações da função do eixo HPA e como o aumento dos níveis de corticosterona conforme sugerido por outros autores (ZORRILLA et al., 2001; GUPTA; EARLEY; CROWE, 2007; KRANENDONK et al., 2008).

De relevância, observamos que os frangos desafiados com *Salmonella* mantiveram baixos níveis de ganho de peso e de consumo de ração. O fator CA (ganho de peso/consumo de ração) – que analisa quantos gramas de ração é necessária para ganhar 1 (um) grama de peso – foi estatisticamente maior quando os animais foram estressados e desafiados com *Salmonella*, mostrando este fato a existência de uma interação entre os efeitos do estresse e a infecção por *Salmonella*. Nesse contexto, sabe-se que algumas interleucinas como a IL-1 e a IL-6 quando liberadas na vigência de processos inflamatórios ao cair na circulação produzem aumento dos níveis de corticosterona e, também, comportamento doentio (JOHNSON, 1998; CONNOR et al., 2002; COHN; DE SA-ROCHA, 2006; BESEDOVSKY; DEL REY, 2011). Neste sentido, um dos sintomas do “comportamento doentio” é a redução do apetite.

Em seu conjunto, quer nos parecer que a diminuição do desempenho das aves possa ter sido decorrência de: 1) uma ação direta do estresse no SNC, 2) uma ação indireta via aumento dos níveis de corticosterona induzido pelo estresse e/ou por citocinas, 3) do aparecimento de um comportamento doentio e 4) não se pode descarta, no entanto, a possibilidade de que a absorção de nutrientes teria sido alterada em decorrência de lesões da mucosa intestinal em função do estresse aplicado e da presença de bactéria, como já mostrado por nós e por outros autores após o estresse (MITCHELL; CARLISLE, 1992; BURKHOLDER et al., 2008; QUINTEIRO-FILHO et al., 2010). Por certo, nada nos impede de que todos estes fatores tenham atuado em conjunto, modulando a ingestão e a absorção dos nutrientes necessários ao bom rendimento do plantel. Qualquer que seja o mecanismo, esses resultados têm relevância econômica; eles mostram que a ingestão ou absorção de nutrientes é

menor em animais estressados e inoculados com *Salmonella*, acarretando este fato a necessidade de maior fornecimento de alimento ou de mais tempo para se atingir o peso ideal para o abate.

Infecções por *Salmonella* são importantes por causar diarreias e enterites em aves, podendo evoluir para infecções sistêmicas. A infecção por *Salmonella* difunde-se rapidamente ao longo do trato gastrointestinal, invadindo a mucosa através do intestino, podendo chegar ao baço e fígado (CHAPPELL et al., 2009). A mucosa intestinal tem sido colocada como a primeira linha de defesa do organismo contra infecções orais a patógenos, como pela *Salmonella* (FAGARASAN; HONJO, 2003; FAGARASAN, 2006).

As infecções por *Salmonella* são descritas como ocorrendo em três fases distintas, todas com grande envolvimento do sistema imune. A primeira delas corresponde à invasão orgânica via sistema gastrointestinal; a segunda diz respeito ao estabelecimento de uma infecção sistêmica como, por exemplo, a infecção intracelular dos macrófagos; e, finalmente, a terceira fase, na qual a infecção é debelada ou não pelo sistema imune, levando os animais a um quadro irreversível de infecção e ao óbito ou ao desenvolvimento de estágios subclinicos de infecção, tornado-os portadores da *Salmonella* (CHAPPELL et al., 2009).

Em princípio, a infecção por *Salmonella* pela via oro-fecal em aves ocorre de maneira semelhante à que se observa em mamíferos. Em mamíferos, a *Salmonella* ao invadir o epitélio intestinal pelas placas de Peyer e células M no íleo, induz enterite em muitas espécies animais, que ocorre em decorrência da combinação de fatores de secreção das Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* (SPI-1), pelo sistema de secreção tipo III e pelo reconhecimento de flagelos e LPS via receptores do tipo *toll* e outros receptores descritos em células imunes (WALLIS et al., 1999; GEWIRTZ et al., 2000; SHIVAPRASAD, 2000; WALLIS; GALYOV, 2000; GEWIRTZ et al., 2001; ZENG et al., 2003). Esses fatores medeiam à liberação de citocinas pro-inflamatórias e quimiocinas, levando ao recrutamento de neutrófilos.

Neste sentido, é importante ressaltar que existem diferenças relevantes na estrutura e na organização imunológica do trato gastrointestinal de mamíferos e de aves (SMITH; BEAL, 2008). Assim, por exemplo, o intestino delgado das aves não apresenta linfonodos e estruturas concentradas de Placas de Peyer, mas, sim, estruturas linfóides agregadas e placas de Peyer difusas por toda a mucosa intestinal (SMITH; BEAL, 2008). Após a infecção de aves pelos diversos sorovares de *Salmonella*, o principal local da colonização pela bactéria é o ceco. As tonsilas cecais são os maiores órgãos linfóides secundários do sistema gastrointestinal das

aves. Situadas na junção íleo-cecal, elas estão diretamente envolvidas com processos inflamatórios e com os mecanismos de invasão de *Salmonella* pelo trato gastrointestinal (CHAPPELL et al., 2009). Durante a infecção por *Salmonella enteritidis*, relatou-se presença de heterófilos e de macrófagos para o intestino delgado das aves, com posterior aumento na expressão da quimiocina CXC (HUGHES et al., 2007; CHAPPELL et al., 2009). Vale destacar aqui o importante papel desempenhado pelo IFN-γ (antigamente chamado de fator ativador de macrófagos) na resposta imune inata e adquirida. Essa citocina ativa os macrófagos, aumentando a expressão de receptores MHC classe 1 e de classe 2 (PESTKA; KRAUSE; WALTER, 2004); o INF-γ ainda regula positivamente o reconhecimento, o processamento e a apresentação de patógenos, os efeitos antimicrobicidas e o tráfico de leucócitos. Mais especificamente, o INF-γ é liberado por linfócitos Th1, agindo sobre receptores de citocinas classe II de macrófagos. Esses macrófagos, dessa forma, são ativados para exercer a função citotóxica efetiva, isto é, para produzir degradação de patogenos intracelulares (SCHRODER et al., 2004).

Após a invasão da *Salmonell*a, acredita-se que haja participação dos macrófagos e/ou das células dendríticas na eventual invasão bacteriana via sistema linfático para o fígado e o baço (CHAPPELL et al., 2009). A interação entre *Salmonella* e macrófagos é, assim, o ponto chave para a evolução da infecção sistêmica em mamíferos e em aves (BARROW; HUGGINS; LOVELL, 1994). As *Salmonellas* têm, neste sentido, desenvolvido um sistema que permite sua sobrevivência dentro dos macrófagos, particularmente o sistema de secreção tipo III de Ilhas Patogênicas tipo 2 (SPI-2). O SPI-2 libera seus efetores dentro da célula do hospedeiro, em especial no vacúolo fagocítico do macrófago. Esse processo interfere com o trafico intracelular de organelas, prevenindo a fusão do fagossomo com o lisossomo, podendo afetar a secreção de citocinas e a expressão de MHC (CHEMINAY; MOHLENBRINK; HENSEL, 2005). Desta forma, esse mecanismo permite que os macrófagos carreiem bactérias para fígado e baço.

Na terceira fase da infecção por *Salmonella*, as aves podem controlar a replicação bacteriana, como acontece nos animais que apresentam fatores genéticos de resistência contra *Salmonella*, eliminando as bactérias com auxilo da imunidade adaptativa. Assim, se a replicação bacteriana não for controlada pela imunidade inata, a *Salmonella* pode replicar-se no baço e no fígado, causando hepato e esplenomegalia e lesões nesses órgãos (COBURN; GRASSL; FINLAY, 2007; CHAPPELL et al., 2009).

Os macrófagos ativados secretam substâncias importantes para a resposta imunológica, dentre as quais os componentes do sistema complemento, as citocinas e as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. De fato, quando da transformação de monócitos em macrófagos e, na vigência de uma resposta celular, observa-se produção e liberação de vários produtos, dentre eles as espécies reativas de oxigênio (ERO). Essas moléculas são resultantes de uma sequência de reações bioquímicas de alto consumo de oxigênio, conhecidas coletivamente como *"burst oxidativo"* (COHN, 1978). Especificamente, o aumento do metabolismo de oxigênio resulta em diversos metabólitos, dentre os quais os mais estudados são o superóxido e o peróxido de hidrogênio (H_20_2). Este último é conhecido por ser o principal componente do aparato microbicida dos macrófagos e neutrófilos (ROOT et al., 1975; NATHAN; ROOT, 1977). Neste sentido, mostramos (ANEXO A) utilizando um protocoloco semelhante ao utilizado neste trabalho, que o estresse por calor (31±1°C) foi capaz de diminuir o *burst* oxidativo de macrófagos de frangos de corte (QUINTEIRO-FILHO et al., 2010). Desta forma, parece plausível sugerir que a atividade microbicida dessas células seja debilitada pelo estresse, permitindo a sobrevivência das bactérias intracelularmente. Neste sentido, estressores químicos foram capazes de diminuir a atividade de macrófagos e de neutrófilos, aumentando o desenvolvimento de infeccoes por *Mycobcterium bovis* (RIGHI et al., 1999; DOMINGUES-JUNIOR et al., 2000; PALERMO-NETO et al., 2001). Destaca-se, ainda, que macrófagos detêm receptores para glicorticóides, molécula que apresenta importante característica imunomoduladora. De fato, diversos trabalhos do nosso e de outros laboratórios têm demonstrado que a exposição de roedores a uma situação de estresse, seja na fase pré-natal como seja na fase adulta, alteram a capacidade funcional dos macrófagos, fato também relatado por nosso grupo em frangos de corte (PALERMO NETO; MASSOCO; FAVARE, 2001b; FONSECA; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2002; PALERMO-NETO; DE OLIVEIRA MASSOCO; ROBESPIERRE DE SOUZA, 2003; QUINTEIRO-FILHO et al., 2010; QUINTEIRO-FILHO et al., 2012b; DE SOUZA QUEIROZ et al., 2013).

Destaque-se, ainda, que os níveis de IFN-γ estavam diminuídos nas aves estressadas e infectadas com *Salmonella* (grupo PHS31°C) em relação aos demais grupos analisados. Como já salientado, os macrófagos ativados pelo INF-γ têm atividade antimicrobiana e antitumoral, bem como capacidade de regular positivamente o processamento e as vias de apresentação de antígeno. O INF-γ, assim como a IL-12 e o TNF, iniciam uma casacata de eventos que resultam na resistência orgânica mediada por macrófagos e células NK (TRIPP; WOLF; UNANUE, 1993). As células T auxiliares, em um microambiente de IL-12 secretada por

macrófagos e de INF-γ produzido por células NK, podem diferenciar-se em células Th1 (GULERIA; POLLARD, 2001) que sintetizam mais INF-γ, amplificando a resposta dos macrófagos (SCHRODER et al., 2004). Assim, a diminuição dos níveis plasmáticos de INF-γ e a diminuição da expressão de IL-12 mostradas no presente trabalho sugerem uma falha na produção dessas citocinas e, consequentemente, na ativação dos macrófagos dos animais estressados por calor e infectados com S*almonella.*

A busca do entendimento da maior incidência de *Salmonella* nos animais estressados remeteu à análise do papel da expressão de citocinas em dois órgãos linfóides das aves: o baço e a tonsila cecal. O estresse por calor alterou a expressão de citocinas e de AvBD-4, AvBD-6 e TLR-2 em frangos de corte desafiados com *Salmonella enteritidis*. Especificamente, observamos que o 1) estresse por calor (31°C) diminuiu a expressão de IL-6 e IL-12 no baço dos animais infectados por *Salmonella enteritidis*, tendo-se observado interação positiva entre os fatores estresse por calor e infecção por *Salmonella* (os dois fatores juntos são responsáveis pela diminuição); 2) a infecção por *Salmonella* aumentou a expressão de IL-1β e TGF-β na tonsila cecal, porém, e curiosamente, quando da presença conjunta do estresse por calor e da infecção por *Salmonella*, as expressões dessas duas citocinas diminuíram; 3) o estresse por calor e a infecção por *Salmonella* diminuiram a expressão de AvBD-4 e AvBD-6 em tonsila cecal dos frangos de corte; e, 4) o estresse por calor diminuiu a expressão de TLR-2 no baço e na tonsila cecal dos frangos de corte infectados com *Salmonella enteritidis*.

Mostrou-se que a expressão de IL-1 e de TNF-α está aumentada durante o curso da infecção por *Salmonella* (ECKMANN; KAGNOFF, 2001). Mostrou-se, ainda, que a neutralização ou inibição da produção dessas citocinas aumento a severidade das infecções por *Salmonella*, diminuindo a sobrevida dos hospedeiros (NAUCIEL; ESPINASSE-MAES, 1992; KLIMPEL et al., 1995; ECKMANN; KAGNOFF, 2001). Pesquisadores mostraram que o tratamento com IL-1 aumentou a sobrevida de camundongos infectados com *Salmonella* patogênica. (MORRISSEY; CHARRIER; VOGEL, 1995). Assim, juntos, nossos dados e os de literatura indicam a importância da IL-1 e do TNF-α na resposta imune contra este patógeno.

Destaque-se, então, que os frangos de corte estressados por calor e infectados por *Salmonella* apresentavam redução na expressão gênica de IL-1β. Especificamente, o grupo de animais apenas infectados com *Salmonella enteritidis* (grupo PC) mostrou aumento da expressão de IL-1β, sinalizando a tentativa do hospedeiro em debelar a infecção pelo

patógeno. Porém, ao submeter-se o animal a um estímulo estressor e ao desafio com *Salmonella* (grupo PHS31°C), a expressão de IL-1 mostrou-se diminuída, logo deficiente na resposta contra esse patógeno.

Sabe-se que muitos tipos celulares apresentam receptores para IL-1β; porém, ainda não esta claro como essa citocina exerce suas funções na defesa contra *Salmonella*. Acredita-se em efeitos da IL-1β na estimulação da atividade dos macrófagos, células que, como ja discutido, são criticas na determinação da resposta orgânica frente ao processo infeccioso (ECKMANN; KAGNOFF, 2001).

Outra citocina de grande importância na resposta inflamatória é a IL-6. Sabe-se estar a IL-6 envolvida, juntamente com a IL-1 e com o TNF-α, nas respostas pró-inflamatórias dos organismos. Da mesma maneira como relatado para a IL-1β, mostramos que aves estressadas e infectadas com *Salmonella* apresentaram diminuição na expressão de IL-6, reforçando este achado a sugestão de que o estresse por calor tenha prejudicado a resposta imune de frangos de corte à *Salmonella*.

Observamos, também, diminuição na expressão gênica de IL-12 nos frangos de corte estressados por calor e desafiados com *Salmonella*. Esta interleucina relacionada à resposta pró-inflamatória estimula a imunidade, desenvolvendo uma resposta imune Th1, essencial para a resistência orgânica a diversos tipos de infecções como, por exemplo, contra *Salmonella* (ECKMANN; KAGNOFF, 2001; DE JONG et al., 2012). Mostrou-se que infecções por *Salmonella* aumentam a expressão de IL-12 em placa de Peyer, linfonodos, baço e fígado (BOST; CLEMENTS, 1995; ECKMANN; FIERER; KAGNOFF, 1996). De forma semelhante, encontramos aumento de IL-12 em nossos estudos; mais especificamente, quando os animais foram infectados com *Salmonella* (grupo PC). Porém, observamos que após o estresse por calor, a expressão de IL-12 diminuiu (grupo PHS31°C). Neste sentido, já se relatou que a redução dos níves dessa interleucina resultou em aumento da contagem bacteriana em baço e diminuição da sobrevida do hospedeiro, enquanto o tratamento com IL-12 aumentou a sobrevida dos animais (KINCY-CAIN; CLEMENTS; BOST, 1996). Nossos dados, de certa forma, corroboram com esses achados, mostrando a existência de uma relação entre o aumento da contagem de *Salmonella* no baço (QUINTEIRO-FILHO et al., 2012a) e a diminuição na expressão de IL-12 em frangos de corte estressados por calor.

Dentro desse contexto, Shini e colaboradores (2010) mostraram que o aumento dos níveis de corticosterona modula citocinas e quimiocinas. Em especial, esses autores relataram que o tratamento crônico com corticosterona diminuiu a expressão de RNAm para citocinas

pro-inflamatórias (IL-1β, IL-6, and IL-18), tendo sugerido diminuição da resposta imune. Podemos assim sugerir a participação do eixo HPA na expressão de citocinas dentro do modelo de estresse por calor agora estudado em aves. Ressaltando, que os resultados mais expressivos foram observados no grupo PHS31°C, sugerindo este fato que o estresse seja mais deletério para as aves quando da presença de um desafio patogênico, como já demostrado em animais de laboratório (PEREZ et al., 2007; BOTTASSO; MORALES-MONTOR, 2009; PEREZ; BOTTASSO; SAVINO, 2009).

Sabe-se que as citocinas anti-inflamatórias, em especial a IL-10 e o TGF-β atuam na regulação da reposta inflamatória e no balanço de linfócitos Th1-Th2. Nossos resultados mostraram uma diminuição de IL-10 nos frangos de corte estressados e infectados com *Salmonella*; porém, não encontramos interação entre os dois fatores. A IL-10 está mais relacionada com a resposta imune que antecede as respostas adaptativas, envolvendo-se em especial com a na imunidade epitelial em diversos processos infecciosos. Esta citocina é essencial para a manutenção da integridade dos tecidos epiteliais, incluindo-se aqui o epitélio intestinal. Destaque-se que a IL-10 e as citocinas classificadas como de sua família (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26) promovem a imunidade inata no tecido epitelial, limitando o dano causado por infecções virais e bacterianas, facilitando os processos de cicatrização (OUYANG et al., 2010). A IL-10 pode ainda reprimir processos pró-inflamatórios, previnindo lesões desnecessárias. Neste sentido, deficiências na resposta de IL-10 foram relacionadas à hiperplasia na mucosa intestinal, ao aumento das reações inflamatórias e à expressão anormal de MHC II no epitélio intestinal (KUHN et al., 1993), mostrando estes achados o papel indispensável dessa citocina nas infecções e processos inflamatórios (OUYANG et al., 2010). Portanto, a presente observação de diminuição de IL-10 em tonsila cecal (órgão linfoide auxiliar do intestino) dos frangos, sugere a ocorrência de um descontrole do processo inflamatório induzido pela *Salmonella* tendo-se alterado, dessa forma, a permeabilidade intestinal o que teria facilitado à invasão da bactéria.

Observamos, no presente trabalho, um aumento da expressão TGF-β tanto após o estresse por calor (grupo HS31°C) como após a infecção por *Salmonella* (grupo PC) em frangos de corte. Entretanto, quando os fatores estresse e infecção foram aplicados juntos (grupo PHS31°C), a expressão de TGF-β foi reduzida. A participação desta citocina na regulação dos processos inflamatórios e na resposta frente a patógenos ainda não esta totalmente clara. Entretanto, sabe-se que a administração de TGF-β diminuiu a contagem de bactérias no baço e fígado de camundongos infectados com *Salmonella*, aumentando a

sobrevida dos animais (GALDIERO et al., 1999; ECKMANN; KAGNOFF, 2001). Essa ação foi explicada pelo aumento da expressão de INF-γ e iNOS no baço dos camundongos, e pelo aumento dos níveis séricos de INF-y e liberação de NO por macrófagos neste órgão (GALDIERO et al., 1999). Assim, acredita-se que a TGF-β tenha o papel de proteção contra infecção por *Salmonella*. Neste sentido, embora possa ser esperado um papel supressor da inflamação mediado pela TGF-β (via diminuição dos níveis de IL-6), prejudicando-se a defesa do hospedeiro, acredita-se que a ação direta de TGF-β na expressão de iNOS por macrófagos, seja, aparentemente mais importante para determinar os efeitos globais dessa citocina na resposta contra a *Salmonella* (ECKMANN; KAGNOFF, 2001; COBURN; GRASSL; FINLAY, 2007).

De maneira geral, a magnitude e a duração da resposta imune são determinadas pelos sinais transmitidos pelos TLRs, pela produção de citocinas e pela ativação de células imunes efetoras. Os TLR são receptores reconhecedores de padrão (PRR), mais especificamente classificam-se como receptores reconhecedores de patógenos, os famosos "PAMPs" (BALARAM; KIEN; ISMAIL, 2009; ST PAUL et al., 2013). Os TLR conectando-se a outras proteínas de membrana iniciam a transdução de sinal a partir da ativação por um antígeno. Após essa primeira ativação, a cascata de sinalização se inicia através de domínios TIR, os quais interagem com proteínas adaptadoras citoplasmáticas, incluindo-se aqui TIR- AP/MAL, TRIF, TRAM, SARM, e a mais utilizada de todas a *MyD88* (BALARAM; KIEN; ISMAIL, 2009; ST PAUL et al., 2013). A Sinalização dos TLRs resulta, então, na produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) e na ativação do fator de transcrição NF-kB, que induz à produção de citocinas pró-inflamatórias, de cyclooxigenase-2 (Cox-2), iNOS, e de peptídeos antimicrobianos (ex. β-defensinas), entre outras moléculas de defesa. (LAZAREVIC; NOLT; FLYNN, 2005; BALARAM; KIEN; ISMAIL, 2009).

Observamos em nosso trabalho que a expressão de TLR-2 estava diminuída tanto no baço como na tonsila cecal dos frangos estressados e infectados com *Samonella*. Diminuição na expressão de TLR-2, TLR-4 e TLR-21 já foi associada a uma menor resistência de galinhas poederias a uma infecção por *Salmonella enteritidis* (GOU et al., 2012). Porém, neste trabalho não observamos diferenças em TLR-4 entre os diferentes grupos de aves analisados; esses dados sugerem a importância da participação da via de sinalização do TLR-2 na expressão das citocinas analisadas neste trabalho. A inexistência de alteração na expressão de *MyD88*, agora detectada, sugere que a sinalização citoplasmática esteja alterada, quiçá em

decorrência de modificações em outros componentes da sinalização que poderiam estar debilitados (por exemplo, vias TIR- AP/MAL, TRIF, TRAM ou SARM).

Outro grupo de moléculas que auxilia a resposta imune frente a uma bactéria patogênica são os peptídeos antimicrobianos, ou defensinas (GANZ, 2003). As defensinas são classificadas em três grandes grupos, α, θ e β, sendo que em aves as β-defensinas são as mais relevantes (AvBD). Além das AvBD atuarem de forma direta sobre os microorganismos, apresentam alguns efeitos imunomodulatórios, como: promoção da imunidade adaptativa pelo recrutamento de monócitos, linfócitos T, células dendriticas e mastócitos para o local da inflamação; estas moleculas tambem estimulam a fagocitose de macrófagos. (ICHINOSE et al., 1996; VAN DIJK; VELDHUIZEN; HAAGSMAN, 2008).

Nossos dados mostram que frangos de corte estressados por calor e infectados por *Salmonella* apresentam diminuição na expressão de AvBD-4 e AvBD-6 em tonsila cecal. Falhas na produção de algumas destas defensinas foram relacionadas com uma maior suscetibilidade a infecções por *Salmonella* em camundongos (GANZ, 2003). Outros autores demonstraram que a expressão de peptídeos antimicrobianos pode ser regulada por mecanismos que envolvem os glicocorticóides e os receptores β-adrenérgicos, via modificações na permeabilidade e defesa das mucosas. Dessa forma, quer nos parecer possivel, relacionar os efeitos do estresse por calor, e o aumento dos níveis de corticosterona por ele induzido, com a expressão das β-defensinas aviárias nos frangos de corte.

Optou-se ainda, por analisar a expressão de *HSP70* nas aves estressadas e infectados por calor, pois não havia informações que relacionassem a expressão desta proteína, às funções imunes e à resistência de aves estressadas às doenças. Nossos resultados mostram um aumento da expressão de *HSP70* em baço quando os animais foram estressados, não se alterando os valores nos grupos PC e PHS31°C. O aumento da expressão de *HSP70* em situações de estresse já vem sendo descrito, tendo sido relacionado com a aquisição de termotolerância, immunossupresão e com a recuperação mais rápida da desnaturação protéica induzida por calor (MALOYAN; PALMON; HOROWITZ, 1999; ZHEN et al., 2006; JOLESCH et al., 2012), provavelmente numa real tentativa de conter os danos fisiológicos causados pelo aumento da temperatura ambiental.

Entretanto, analisando-se nossos dados de forma mais atenta, observamos que quando os animais foram estressados e infectados por *Salmonella*, a expressao do *HSP70* no grupo HS31°C estava semelhante aquela dos grupos controles (grupo controle e PC). Isso sugere que a ação do *HSP70*, em facilitar as ligações antígeno-receptores nas células imunes, poderia

estar prejudicada nestas aves. Neste sentido, para interagir com as células do sistema imune, as *HSPs* precisam mudar a sua clássica localização, intracelular, para o ambiente extracelular; a *HSP70* no ambiente extracelular liga-se a antígenos e forma complexos peptídicos que são reconhecidos por receptores de células imunes. Como exemplo, citam-se a ligação com endotoxinas bacterianas como o LPS, ou com lectina e flagelinas, que formarão complexos peptídicos que facilitarao a ligação nos receptores tipo *toll* (TLR-2, TLR-4 ou TLR-5) iniciando-se a sinalização intracelular para maturação e liberação de citocinas (JOLESCH et al., 2012). Assim, as *HSPs* não só anunciam a presença de perigo, com também informam o sistema imunológico sobre a identidade do "inimigo. Bendz e colaboradores mostraram que a união *HSP70* às endotoxinas estimula os TLRs de células dendríticas; entretanto, apenas a presença da *HSP70* não causa efeitos estimulatórios em células imunes (BENDZ et al., 2008).

Mostrou-se que um aumento da expressão de *HSP70* protege a integridade da mucosa intestinal após o estresse por calor, devido à diminuição significativa da desidrogenase láctica. Além disso, as *HSP70* aumentam a atividade de enzimas oxidantes (tais como a superóxido dismutase, a glutationa peroxidase e a capacidade antioxidante total) inibindo a peroxidação lipídica e minimizando lesões oxidativas presentes na mucosa intestinal. Esses resultados sugerem que a *HSP70* sejam capazes de proteger a mucosa intestinal do estresse por calor, através do aumento da capacidade antioxidante e inibição da produção de peroxidação lipídica (GU; HAO; WANG, 2012). Assim, este fato poderia ter ocorrido em nosso trabalho. Se assim for, podemos sugerir que o estresse por calor *per se* também tenha aumentado a expressão de *HSP 70* no intestino dos frangos de corte, não permitindo o desenvolvimento de lesões mais severas (enterite leve). Diferente do observado nos animais estressados e infectados com *Salmonella* (grupo PHS31°C), os quais apresentaram enterite moderada e expressão de *HSP70* diminuidas a valores semelhantes ao do grupo Controle.

Ao desafiar experimentalmente os frangos com *Salmonella enteritidis* e submetê-los a um estresse por calor, observamos a presença da bacteria em papo, ceco e fígado. Observamos, também, presença de *Salmonella* na medula óssea dos animais estressados e infectados (grupo PHS31°C). Desta forma, quer nos parecer que tenha acontecido uma falha na eliminação e controle dessa bactéria nos animais estressados. De fato, observarmos aumento da invasão de *Samonella enteritides* para o baço dos frangos estressados pelo calor (Figura 13), muito provavelmente em função da quebra da barreira imune observada.

Alguns estudos mostraram a capacidade que têm as bactérias da microbiota de camundongos de migrar para órgãos linfóides e fígado, podendo até mesmo chegar ao pulmão

quando esses animais são estressados cronicamente (KIANK; DAESCHLEIN; SCHUETT, 2008). Neste trabalho os autores relacionaram a migração bacteriana em camundongos com as disfunções imunes ocorridas na barreira intestinal e com os fatores ligados ao processo de migração bacteriana (KIANK; DAESCHLEIN; SCHUETT, 2008). Dada a importância dos macrófagos na migração de *Salmonella* para baço e o importante papel do *busrt oxidativo,* e da ativação destas células pelo INF-γ, parece-nos plausível sugerir que o maior número de UFC/g de *Salmonella* por nós detectados no baço das aves, esteja relacionado com a diminuição da atividade de macrófagos em função do aumento dos níveis de corticosterona encrontrados após o estresse por calor aplicado. Soma-se a este fator, ainda, as ações diretas e indiretas da diminuição da expressão de IL-1β, IL-6, IL12, IL-10, TGF-β, AvBD-4 e AvBD-6 sobre as funções imunes e a invasibilidade da *Salmonella*.

Muitos autores já observaram que diferentes tipos de estressores atuam sobre a resposta imune humoral de frangos de corte (MASHALY et al., 1998; KHAJAVI et al., 2003; POST; REBEL; TER HUURNE, 2003; MASHALY et al., 2004; SHINI et al., 2008a). Mashaly e colaboradores (2004), em especial, mostraram que um estresse prolongado por calor (35°C por 5 semanas) diminuiu o número de leucócitos circulantes e a produção de anticorpos para hemácias de carneiro. Um estresse por calor (39°C por 7h/d) mantido por 6 dias diminuiu o numero de Linfócitos CD4+ e CD8+ e os títulos de anticorpos para SRBC (KHAJAVI et al., 2003). Outros autores observaram que frangos de corte tratados experimentalmente com doses de corticosterona, que mimetizavam aquelas encontradas em situações de estresse, apresentaram diminuição nos níveis de anticorpos para SRBC e menor resposta vacinal (POST; REBEL; TER HUURNE, 2003; SHINI et al., 2008a).

Observamos, neste sentido, que o estresse por calor *per se*, isto é, atuando isoladamente não foi capaz de alterar significantemente os níveis de IgA dos frangos corte. No entanto, nos animais estresados e infectados pela *Samonella* (grupo PHS31°C), os níveis plasmáticos de IgA mostraram-se menores nos animais estressados quando comparados aos do grupo controle, sugerindo este achado que os efeitos deletérios do estresse na resposta imune humoral desses animais sejam melhor observado quando o sistema imune das aves é desafiado. A secreção de IgA na mucosa intestinal é importante para a proteção contra patógenos bacterianos, parasitários e virais (FAGARASAN, 2006) e, também, para a proteção contra proteínas estranhas (impedindo a penetração das mesmas pelo epitelio intestinal); a IgA, também, neutraliza toxinas e microorganismos infecciosos (MESTECKY; RUSSELL; ELSON, 1999; REVOLLEDO; FERREIRA; FERREIRA, 2009). Dessa forma, além de

diminuir a atividade de macrófagos, os níveis de INF-γ, e a expressão de citocinas e AvBDs, o estresse crônico por calor aplicado neste trabalho diminuiu também os níveis sistêmicos de IgA em frangos de corte infectados com *Salmonella*. Podemos assim, inferir, que há diminuição da atividade de macrófagos e da produção de IgA na mucosa intestinal, tendo-se prejudicado a primeira linha de defesa do organismo contra invasões de microorganismos, facilitando o aparecimento das lesões observadas nesse órgão, que redundaram em diminuicao da integridade intestinal e na migração bacteriana.

Muitos autores mostraram que o estresse afeta a integridade da barreira intestinal, que é formada por enterócitos, junções intraepiteliais, muco e células imunes, como por exemplo, macrófagos (LAMBERT et al., 2002; PROSSER et al., 2004; SINGLETON; WISCHMEYER, 2006; LAMBERT, 2009). A perda da integridade intestinal (ou seja, uma disfunção da barreira intestinal) leva ao aumento da permeabilidade deste órgão e, consequentemente, a uma inflamação local (LAMBERT, 2009). Burkholder et al. (2008) mostraram que frangos submetidos a um estresse por calor (30ºC) durante 24 horas apresentaram alterações na profundidade das criptas do íleo e aumento na adesão de *Salmonella enteritidis* na mucosa do intestino delgado dessas aves. Ainda, Quinteiro-Filho et al. (2010) mostraram que o estresse por calor induziu leve enterite no jejuno de frangos de corte. Nossos atuais resultados estão de acordo com os anteriores e os fortalecem. Observamos presença de enterite discreta caracterizada por aumento de infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário na lamina própria do duodeno, jejuno e íleo dos animais estressados por calor (HS31°C). Observamos, ainda, uma piora no quadro de enterite, quando os animais foram estressados e infectados com *Salmonella enteritidis* (PHS31°C), caracterizando-se este achado por enterite moderada, observada ao longo de todo o intestino delgado. A presença de heterófilos no infiltrado inflamatório pode estar relacionada à invasão bacteriana do epitélio para a lâmina propria do intestino. Outro achado importante refere-se à observação de uma maior área inflamada nos intestinos das aves estressadas e infectados com *Samonella*, isto é, com o maior número de vilosidades e criptas com presença de proeminente infiltrado inflamatório ao longo do intestino (dados não mostrados). Essa observação mostra a piora no quadro entérico encontrado, uma vez que os animais dos grupos PC e HS31°C apresentavam lesões difusas com grandes áreas sem lesão.

Neste sentido, o aumento do infiltrado inflamatório agora observado poderia ter contribuído também para o aumento da liberação algumas citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, IL-1) que atuariam 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 tenha facilitado à transposição de bactérias patogênicas, aumentando a incidência de doenças bacterianas intestinais.

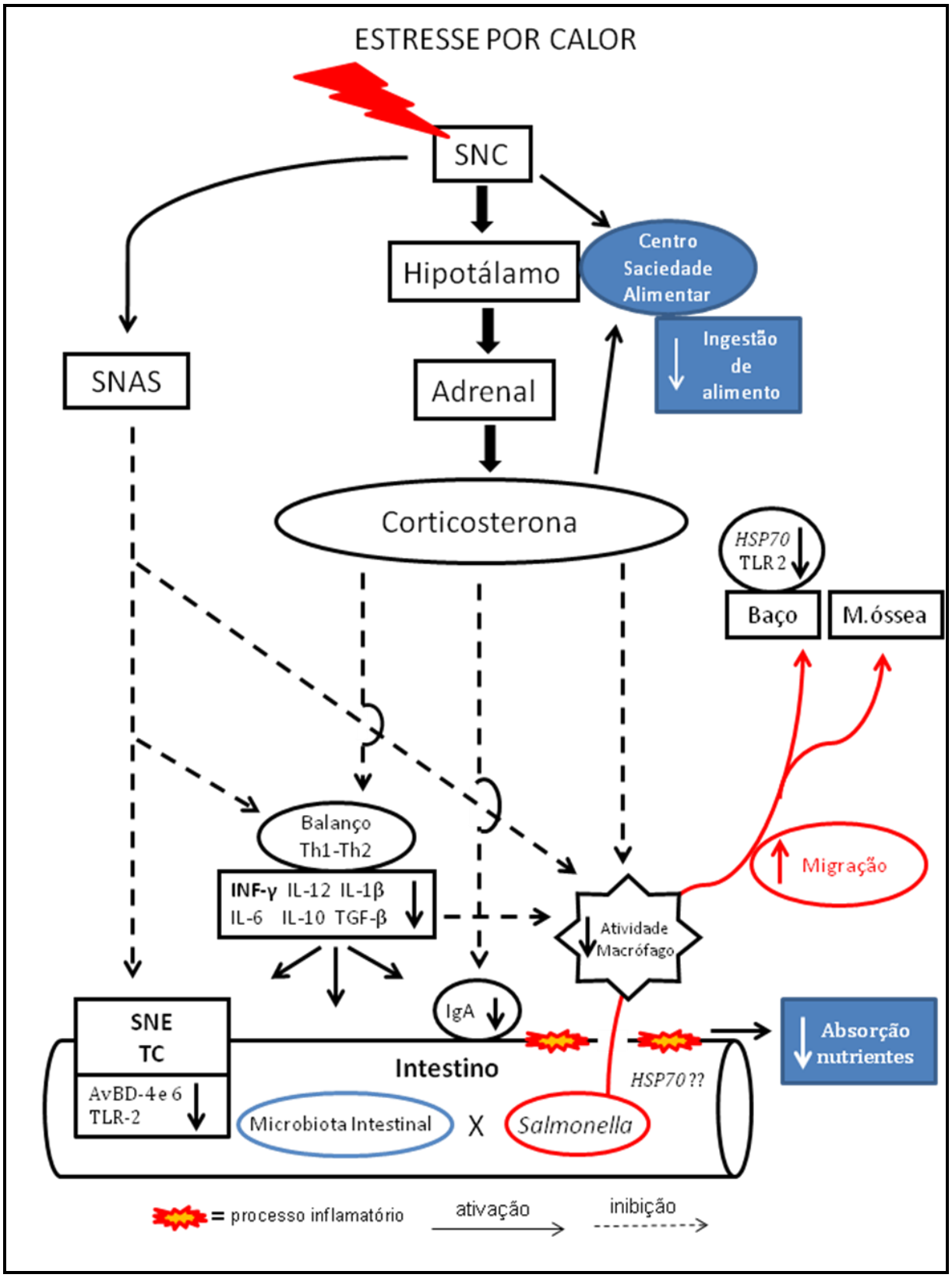
Além das alterações da integridade intestinal, o estresse poderia ter modificado a microbiota indigena do intestino, que por sua vez, protege o hospedeiro contra a colonização de patógenos pela competição no sitio de ligações entre as células intestinais, pela demanda de nutrientes e pela produção de bactericinas (BRISBIN; GONG; SHARIF, 2008; BURKHOLDER et al., 2008). Sabe-se que perturbações no equilíbrio da microbiota intestinal podem diminuir os mecanismos de proteção contra a invasão de bactérias patogênicas, como a bactéria alvo do nosso estudo, a *Salmonella enteritidis* (BURKHOLDER et al., 2008; LAMBERT, 2009).

Finalmente, não se pode esquecer que a sinalização bidirecional entre o trato gastrointestinal e o cérebro é regulada pelo SNC, sistemas neuroendócrino simpático e parassimpático, sistema nervoso entérico (SNE) e a microbiota intestinal (GRENHAM et al., 2011). As interações neuroimunes-epiteliais desempenham um papel protetor no intestino, garantindo a preservação das funções de barreira epitelial e a expulsão de agentes nocivos no intestino (BUENO, 2000; SHARKEY; MAWE, 2002). Essas interações servem para integrar os diversos componentes celulares da mucosa intestinal em uma rede de defesa, assim garantindo a manutenção da homeostase intestinal em face de um desafio patogênico. O componente entérico do sistema nervoso autônomo está ativamente envolvido com a quebra da barreira imune intestinal, em decorrência de uma infecção bacteriana ou parasitária (SHARKEY; MAWE, 2002). A natureza adaptativa da SNE permite que ele atue como um regulador homeostático das funções gastrointestinais, garantir a sobrevivência e a nutrição adequada dos animais (SHARKEY; MAWE, 2002). Uma grande variedade de moléculas sinalizadoras, incluindo-se aqui as citocinas, os neurotransmissores e fatores neurotróficos estão envolvidos na regulação das interações neuroimunes-epiteliais (SHARKEY; MAWE, 2002). Por exemplo, o aumento dos níveis plasmáticos de noradrenalina foi associado a um aumentou da translocação bacteriana no intestino (HART; KAMM, 2002). Nesse sentido, embora a resposta inflamatória aguda aconteça inicialmente para proteger o intestino, se o desafio externo é muito severo e/ou prolongado, as alterações de arquitetura intestinal acontecem, desencadeando-se processos inflamatórios crônicos.

Em seu conjunto, os presentes resultados reforçam a hipótese de que o estresse por calor interfira com a resposta imune de frangos de corte, aumentando a suscetibilidade a infecções por *Salmonella enteritidis*. Os dados e a discussão aqui apresentados mostram a importância da atividade dos macrófagos, da expressão de citocinas, dos níveis de IgA, bem como das AvBDs e de sua via de sinalização/produção no processo de diminuição da imunidade. Neste contexto, nosso grupo de pesquisa em neuroimunomodulação vem exaustivamente demonstrando que alterações na ativação do eixo HPA e do SNAS, via aumento dos níveis de corticosterona e de catecolaminas respectivamente, alteram as respostas imunológicas dos animais (CASTRO; PALERMO-NETO, 1988; PALERMO NETO; MASSOCO; FAVARE, 2001a; PALERMO-NETO; DE OLIVEIRA MASSOCO; ROBESPIERRE DE SOUZA, 2003; PALERMO-NETO et al., 2008; COSTA-PINTO; PALERMO-NETO, 2010; ALVES; RIBEIRO; PALERMO-NETO, 2011; DE SOUZA QUEIROZ et al., 2013); fato que estendemos para as discussões dos efeitos do estresse em aves (QUINTEIRO-FILHO et al., 2010; QUINTEIRO-FILHO et al., 2012a; QUINTEIRO-FILHO et al., 2012b) (ANEXOS A, B e C). Especificamente, quer nos parecer que o estresse crônico por calor tenha alterado a ativação do eixo HPA e quiça do SNAS e SNE, aumentando os níveis de glicorticóides e de catecolaminas, modulando, dessa forma, os processos inflamatórios/imunológicos nas aves (NANCE; SANDERS, 2007b; KAISER et al., 2009).

Por tudo quanto exposto, sugerimos que o estresse por calor - via ativação do eixo HPA e liberação de corticosterona - tenha diminuído o consumo alimentar e, consequentemente, o ganho de peso e a imunidade dos animais; os níveis aumentados de corticosterona teriam, ainda, diminuído a atividade de macrófagos, os níveis de INF-γ, a expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias, de AvBD e de IgA. Estas alterações neuroimunes teriam diminuído ainda mais a injestão de alimento e conversão alimentar e, principalmente, influenciado a qualidade da barreira imune intestinal, fato que teria possibilitado a migração de bactérias patogênicas pela mucosa intestinal e, via de conseqüência, o aparecimento de maior número de colônias de *Salmonella* no baço e na medula óssea dos animais estressados. Futuros experimentos analizarão a participação do SNAS nos fenômenos agora relatados. A figura 42 ilustra de forma esquemática e simplificada as hipóteses sugeridas acima.

Figura 42 – Figura esquemática das hipóteses sugeridas para os efeitos do estresse por calor sobre a imunidade e migração de *Salmonella*



SNC: Sistema Nervoso Central; SNAS: Sistema Nervoso Autônomo Simpático; SNE: Sistema Nervoso Entérico; TC: Tonsila Cecal; Ig: Imunoglobulina; IL: Interleucina; AvBD: *Avian β-defensins*; TLR: *Toll-like receptor*; INF: *Interferon*; HSP: *heat schock protein;*Th: linfócitos T *helper*.

8 CONCLUSÕES

8.1 CONCLUSÕES ESPECIFICAS

Concluímos que o estresse por calor de 31±1°C, 10h/dia, aplicados por 6 dias, em frangos de corte infectados experimentamente por *Salmonella enteritidis*:

1) Diminuiu o ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar;
2) Aumentou os níveis séricos de corticosterona;
3) Diminuiu os níveis plasmáticos de INF-γ;
4) Diminiu a expressão de IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12 e TGF-β, porém não alterou a expressão de IL-8, IL-13 e IL-17;
5) Diminuiu a expressão de AvBD-4e AvBD-6, porém não alterou a expressão de AvBD-1 e AvBD-2;
6) Diminuiu a expresão de TLR2; porém não alterou a expressão de TLR-4 e *MyD88;*
7) diminuiu os níveis plasmáticos de IgA, porém não alterou os níves de IgG;
8) causou enterite moderadan duodeno, jejuno e íleo, diferentemente do estresse por calor *per se* que apenas causou uma enterite leve;
9) permitiu a migração de *Salmonella enteritidis* para medula óssea e aumentou migração desta bacteria para o baço dos frangos de corte. Não observamos diferenças no fígado.

8. 2 CONCLUSÃO GERAL

Concluímos, que o estresse por calor tenha produzido alterações na atividade neuroimune de frangos de corte, fato evidenciado pelo aumento do nives de corticosterona e

pela diminuição da atividade de macrófagos, dos níveis e INF-γ, da expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias, de β-defensina aviaria 4 e 6, dentro de um contexto de desafio por *Salmonella enteritidis*. Sugerimos que o aumento dos níveis de corticosterona esteja direta ou indiretamente ligada à redução do o consumo de alimentos e, consequentemente do ganho de peso e da CA. Esse glicocorticóide teria atuado, também, e diretamente sobre as células imunes, em especial os macrófagos alterando a cascata de sinalização para a produção de citocinas e de AvBDs, muito provavelmente em decorrência da diminuição da expressão de TLR-2. O aumento dos níveis de corticosterona teria, ainda, atuado nas células responsaveis pela imunidade adquirida, diminuindo os níveis de IgA.

A diminuição dos parâmetros imunes analisados permite inferir que o estresse por calor tenha diminuído a imunidade inata e adquirida a nível intestinal, levando a uma modificação da microbiota comensal e ao aparecimento de um infiltrado inflamatório caracterizado por células mononucleares no intestino delgado das aves e o de colônias de *Salmonella enteritidis* na medula óssea e no baço dos animais estressados.

REFERÊNCIAS

ABDUL-CAREEM, M. F.; HUNTER, B. D.; PARVIZI, P.; HAGHIGHI, H. R.; THANTHRIGE-DON, N.; SHARIF, S. Cytokine gene expression patterns associated with immunization against Marek's disease in chickens. **Vaccine**, v. 25, n. 3, p. 424-432, 2007.

ABDUL-CAREEM, M. F.; HUNTER, B. D.; SARSON, A. J.; MAYAMEEI, A.; ZHOU, H.; SHARIF, S. Marek's disease virus-induced transient paralysis is associated with cytokine gene expression in the nervous system. **Viral Immunology**, v. 19, n. 2, p. 167-176, 2006.

ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual Review of Immunology**, v. 17, n., p. 593-623, 1999.

AGARWAL, S. K.; MARSHALL, G. D., JR. Dexamethasone promotes type 2 cytokine production primarily through inhibition of type 1 cytokines. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 21, n. 3, p. 147-155, 2001.

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.

AL-SADI, R. M.; 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.

ALBUQUERQUE, R. D.; MARCHETTI, L. K.; FAGUNDES, A. C. A.; BITTENCOURT, L. C.; TRINDADE NETO, M. A. D.; LIMA, F. R. D. Efeito de diferentes densidades populacionais e do sexo sobre o desempenho e uniformidade em frangos de corte. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n., p. 581-587, 2006.

ALLEN, P. C.; DANFORTH, H. D.; AUGUSTINE, P. C. Dietary modulation of avian coccidiosis. **Int J Parasitol**, v. 28, n. 7, p. 1131-1140, 1998.

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, n. 4, p. 545-550, 2003.

ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. Neuroimunomodulação: sobre o diálogo entre os sistemas nervoso e imune. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 29, n. 4, p., 2007.

ALVES, G. J.; RIBEIRO, A.; PALERMO-NETO, J. The neuroimmune changes induced by cohabitation with an Ehrlich tumor-bearing cage mate rely on olfactory information. **Brain Behavior and Immunity**, v., n., p., 2011.

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

ARMAIZ-PENA, G. N.; COLE, S. W.; LUTGENDORF, S. K.; SOOD, A. K. Neuroendocrine influences on cancer progression. **Brain, Behavior and Immunity**, v., n., p., 2012.

ARMARIO, A.; DAVIU, N.; MUNOZ-ABELLAN, C.; RABASA, C.; FUENTES, S.; BELDA, X.; GAGLIANO, H.; NADAL, R. What can we know from pituitary-adrenal hormones about the nature and consequences of exposure to emotional stressors? **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 32, n. 5, p. 749-758, 2012.

BALARAM, P.; KIEN, P. K.; ISMAIL, A. Toll-like receptors and cytokines in immune responses to persistent mycobacterial and Salmonella infections. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 299, n. 3, p. 177-185, 2009.

BALER, R.; WELCH, W. J.; VOELLMY, R. Heat shock gene regulation by nascent polypeptides and denatured proteins: hsp70 as a potential autoregulatory factor. **The Journal of Cell Biology**, v. 117, n. 6, p. 1151-1159, 1992.

BARROW, P. A.; HUGGINS, M. B.; LOVELL, M. A. Host specificity of Salmonella infection in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system. **Infection and Immunity.**, v. 62, n. 10, p. 4602-4610, 1994.

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, n. 10, p. 1580-1588, 2003.

BENDZ, H.; MARINCEK, B. C.; MOMBURG, F.; ELLWART, J. W.; ISSELS, R. D.; NELSON, P. J.; NOESSNER, E. Calcium signaling in dendritic cells by human or mycobacterial Hsp70 is caused by contamination and is not required for Hsp70-mediated enhancement of cross-presentation. **Journal of Chemical Biology**, v. 283, n. 39, p. 26477-26483, 2008.

BERNARDINO, A. **Programas de vacinação.** Campinas: FACTA, p.179-204
BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Central and peripheral cytokines mediate immune-brain connectivity. **Neurochemical Research**, v. 36, n. 1, p. 1-6, 2011.

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

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Interleukin-1 resets glucose homeostasis at central and peripheral levels: relevance for immunoregulation. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 3, p. 139-141, 2010.

BESEDOVSKY, H. O.; REY, A. D. Physiology of psychoneuroimmunology: a personal view. **Brain Behav Immun**, v. 21, n. 1, p. 34-44, 2007.

BISWAS, S. K.; CHITTEZHATH, M.; SHALOVA, I. N.; LIM, J. Y. Macrophage polarization and plasticity in health and disease. **Immunologic Research**, v. 53, n. 1-3, p. 11-24, 2012.

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

BORDEN, E. C.; SEN, G. C.; UZE, G.; SILVERMAN, R. H.; RANSOHOFF, R. M.; FOSTER, G. R.; STARK, G. R. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 6, n. 12, p. 975-990, 2007.

BOST, K. L.; CLEMENTS, J. D. In vivo induction of interleukin-12 mRNA expression after oral immunization with Salmonella dublin or the B subunit of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 3, p. 1076-1083, 1995.

BOTTASSO, O.; MORALES-MONTOR, J. Neuroimmunomodulation during infectious diseases: mechanisms, causes and consequences for the host. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 2, p. 65-67, 2009.

BOZKURT, M.; KUCUKYILMAZ, K.; CATLI, A. U.; CINAR, M.; BINTAS, E.; COVEN, F. Performance, egg quality, and immune response of laying hens fed diets supplemented with mannan-oligosaccharide or an essential oil mixture under moderate and hot environmental conditions. **Poultry Science**, v. 91, n. 6, p. 1379-1386, 2012.

BRISBIN, J. T.; GONG, J.; PARVIZI, P.; SHARIF, S. Effects of lactobacilli on cytokine expression by chicken spleen and cecal tonsil cells. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 9, p. 1337-1343, 2010.

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

BRISBIN, J. T.; PARVIZI, P.; SHARIF, S. Differential cytokine expression in T-cell subsets of chicken caecal tonsils co-cultured with three species of Lactobacillus. **Beneficial microbes**, v. 3, n. 3, p. 205-210, 2012.

BRISBIN, J. T.; ZHOU, H.; GONG, J.; SABOUR, P.; AKBARI, M. R.; HAGHIGHI, H. R.; YU, H.; CLARKE, A.; SARSON, A. J.; SHARIF, S. Gene expression profiling of chicken lymphoid cells after treatment with Lactobacillus acidophilus cellular components. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 32, n. 5, p. 563-574, 2008.

BROOM, D. M.; MOLENTO, C. F. M. Bem-estar animal: Conceitos e Questões Relacionadas - Revisão **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 2, p. 1-11, 2004.

BUENO, L. Neuroimmune alterations of ENS functioning. **Gut**, v. 47 Suppl 4, n., p. iv63-65; discussion iv76, 2000.

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.

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

CALOGERO, A. E.; BAGDY, G.; SZEMEREDI, K.; TARTAGLIA, M. E.; GOLD, P. W.; CHROUSOS, G. P. Mechanisms of serotonin receptor agonist-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. **Endocrinology**, v. 126, n. 4, p. 1888-1894, 1990.

CALOGERO, A. E.; BURRELLO, N.; NEGRI-CESI, P.; PAPALE, L.; PALUMBO, M. A.; CIANCI, A.; SANFILIPPO, S.; D'AGATA, R. Effects of corticotropin-releasing hormone on ovarian estrogen production in vitro. **Endocrinology**, v. 137, n. 10, p. 4161-4166, 1996.

CASTRO, V. L.; PALERMO-NETO, J. Alterations in the behavior of young and adult rats exposed to aldrin during lactation. **Brazillian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, n. 5, p. 987-990, 1988.

CHAPPELL, L.; KAISER, P.; BARROW, P.; JONES, M. A.; JOHNSTON, C.; WIGLEY, P. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 53-59, 2009.

CHEMINAY, C.; MOHLENBRINK, A.; HENSEL, M. Intracellular Salmonella inhibit antigen presentation by dendritic cells. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 5, p. 2892-2899, 2005.

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

CHEROUTRE, H.; MADAKAMUTIL, L. Acquired and natural memory T cells join forces at the mucosal front line. **Nature reviews. Immunology**, v. 4, n. 4, p. 290-300, 2004.

CHIRICO, W. J.; WATERS, M. G.; BLOBEL, G. 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. **Nature**, v. 332, n. 6167, p. 805-810, 1988.

COBURN, B.; GRASSL, G. A.; FINLAY, B. B. Salmonella, the host and disease: a brief review. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 112-118, 2007.

COHEN, M.; POLLACK, S. Mothers with breast cancer and their adult daughters: the relationship between mothers' reaction to breast cancer and their daughters' emotional and neuroimmune status. **Psychosomatic Medicine**, v. 67, n. 1, p. 64-71, 2005.

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

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

COHN, Z. A. Activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy, and future. **The Journal of Immunology**, v. 121, n. 3, p. 813-816, 1978.

CONNOR, T. J.; O'SULLIVAN, J.; NOLAN, Y.; KELLY, J. P. Inhibition of constitutive nitric oxide production increases the severity of lipopolysaccharide-induced sickness behaviour: a role for TNF-alpha. **Neuroimmunomodulation**, v. 10, n. 6, p. 367-378, 2002.

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. 470-484, 2004.

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

DE BLASI, A.; PARRUTI, G.; SALLESE, M. Regulation of G protein-coupled receptor kinase subtypes in activated T lymphocytes. Selective increase of beta-adrenergic receptor kinase 1 and 2. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 1, p. 203-210, 1995.

DE JONG, H. K.; PARRY, C. M.; VAN DER POLL, T.; WIERSINGA, W. J. Host-pathogen interaction in invasive Salmonellosis. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 10, p. e1002933, 2012.

DE SOUZA QUEIROZ, J.; BARBOSA, C. M.; DA ROCHA, M. C.; BINCOLETTO, C.; PAREDES-GAMERO, E. J.; DE SOUZA QUEIROZ, M. L.; PALERMO NETO, J. Chlorella vulgaris treatment ameliorates the suppressive effects of single and repeated stressors on hematopoiesis. **Brain Behavior and Immunity**, v., n., p., 2013.

DEL REY, A.; BESEDOVSKY, H. O. Sympathetic nervous system-immune interactions in autoimmune lymphoproliferative diseases. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, n. 1, p. 29-36, 2008.

DEL REY, A.; FURUKAWA, H.; MONGE-ARDITI, G.; KABIERSCH, A.; VOIGT, K. H.; BESEDOVSKY, H. O. Alterations in the pituitary-adrenal axis of adult mice following neonatal exposure to interleukin-1. **Brain Behavior and Immunity**, v. 10, n. 3, p. 235-248, 1996.

DENG, W.; DONG, X. F.; TONG, J. M.; ZHANG, Q. The probiotic Bacillus licheniformis ameliorates heat stress-induced impairment of egg production, gut morphology, and intestinal mucosal immunity in laying hens. **Poultry Science**, v. 91, n. 3, p. 575-582, 2012.

DIMITRIJEVIC, M.; STANOJEVIC, S.; KUSTRIMOVIC, N.; LEPOSAVIC, G. End-point effector stress mediators in neuroimmune interactions: their role in immune system homeostasis and autoimmune pathology. **Immunologic Research**, v. 52, n. 1-2, p. 64-80, 2012.

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

DUNN, A. J. Interactions between the nervous system and the immune system. In: Blomm, F. E. K., D.J. (Ed.). **Psychopharmacology: the fourth generation of progress.**: Oxford: Raven Press, 1995., p.719-731.
EBEID, T. A.; SUZUKI, T.; SUGIYAMA, T. High ambient temperature influences eggshell quality and calbindin-D28k localization of eggshell gland and all intestinal segments of laying hens. **Poultry Science**, v. 91, n. 9, p. 2282-2287, 2012.

ECKMANN, L.; FIERER, J.; KAGNOFF, M. F. Genetically resistant (Ityr) and susceptible (Itys) congenic mouse strains show similar cytokine responses following infection with Salmonella dublin. **The Journal of Immunology**, v. 156, n. 8, p. 2894-2900, 1996.

ECKMANN, L.; KAGNOFF, M. F. Cytokines in host defense against Salmonella. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 14-15, p. 1191-1200, 2001.

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

ELENKOV, I. J.; CHROUSOS, G. P. Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 10, n. 9, p. 359-368, 1999.

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

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

FAGARASAN, S. Intestinal IgA synthesis: a primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. **Current topics in Microbiology and Immunology**, v. 308, n., p. 137-153, 2006.

FAGARASAN, S.; HONJO, T. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 1, p. 63-72, 2003.

FAO. **Food Outlokk FAO - Global Marketing Analysis.** Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, p.129
FELTEN, D. L.; FELTEN, S. Y.; BELLINGER, D. L.; CARLSON, S. L.; ACKERMAN, K. D.; MADDEN, K. S.; OLSCHOWKI, J. A.; LIVNAT, S. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. **Immunological Reviews**, v. 100, n., p. 225-260, 1987.

FELTEN, S. Y.; FELTEN, D. L.; BELLINGER, D. L.; CARLSON, S. L.; ACKERMAN, K. D.; MADDEN, K. S.; OLSCHOWKA, J. A.; LIVNAT, S. Noradrenergic sympathetic innervation of lymphoid organs. **Progress in allergy**, v. 43, n., p. 14-36, 1988.

FERREIRA, A. J. P.; LEFFER, A. M.; KUTTEL, J.; MARTINS, L. M.; PEDROSO, A. C.; S., A.-F. C.; FERREIRA, F. Vectorial Competence of Larvae and Adults of *Alphitobius diaperinus* in the Transmission of *Salmonella enteritidis* in Poultry. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 00, p., 2009.

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

FOSTER, J.; BROWN, I. Basal expression of stress-inducible hsp70 mRNA detected in hippocampal and cortical neurons of normal rabbit brain. **Brain Research**, v. 724, n. 1, p. 73-83, 1996.

FRANCHIMONT, D.; GALON, J.; GADINA, M.; VISCONTI, R.; ZHOU, Y.; ARINGER, M.; FRUCHT, D. M.; CHROUSOS, G. P.; O'SHEA, J. J. Inhibition of Th1 immune response by glucocorticoids: dexamethasone selectively inhibits IL-12-induced Stat4 phosphorylation in T lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 4, p. 1768-1774, 2000.

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 U S A**, v. 93, n. 8, p. 3613-3618, 1996.

FURLAN, R. L. Influência da temperatura na produção de frangos de corte. In: Simpósio Brasil Sul De Avicultura (Ed.). **Anais…**. Chapecó: Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuarias, 2006. v.1, p.104-1035.

GALDIERO, M.; MARCATILI, A.; CIPOLLARO DE L'ERO, G.; NUZZO, I.; BENTIVOGLIO, C.; ROMANO CARRATELLI, C. Effect of transforming growth factor beta on experimental Salmonella typhimurium infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 3, p. 1432-1438, 1999.

GANEA, D. Regulatory effects of vasoactive intestinal peptide on cytokine production in central and peripheral lymphoid organs. **Advances in Neuroimmunology**, v. 6, n. 1, p. 61-74, 1996.

GANZ, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 9, p. 710-720, 2003.

GAO, J.; ZHANG, H. J.; YU, S. H.; WU, S. G.; YOON, I.; QUIGLEY, J.; GAO, Y. P.; QI, G. H. Effects of yeast culture in broiler diets on performance and immunomodulatory functions. **Poultry Science**, v. 87, n. 7, p. 1377-1384, 2008.

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. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 290, n. 1, p. R195-201, 2006.

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

GEISSMANN, F.; GORDON, S.; HUME, D. A.; MOWAT, A. M.; RANDOLPH, G. J. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. **Nature reviews. Immunology**, v. 10, n. 6, p. 453-460, 2010.

GERAERT, P. A.; PADILHA, J. C.; GUILLAUMIN, S. Metabolic and endocrine changes induced by chronic heat exposure in broiler chickens: growth performance, body composition and energy retention. **The British Journal of Nutrition**, v. 75, n. 2, p. 195-204, 1996.

GETHING, M. J.; SAMBROOK, J. Protein folding in the cell. **Nature**, v. 355, n. 6355, p. 33-45, 1992.

GEWIRTZ, A. T.; RAO, A. S.; SIMON, P. O., JR.; MERLIN, D.; CARNES, D.; MADARA, J. L.; NEISH, A. S. Salmonella typhimurium induces epithelial IL-8 expression via Ca(2+)-mediated activation of the NF-kappaB pathway. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 1, p. 79-92, 2000.

GEWIRTZ, A. T.; SIMON, P. O., JR.; SCHMITT, C. K.; TAYLOR, L. J.; HAGEDORN, C. H.; O'BRIEN, A. D.; NEISH, A. S.; MADARA, J. L. Salmonella typhimurium translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 1, p. 99-109, 2001.

GIVISIEZ, P. E.; FERRO, J. A.; FERRO, M. I.; KRONKA, S. N.; DECUYPERE, E.; MACARI, M. Hepatic concentration of heat shock protein 70 kD (Hsp70) in broilers subjected to different thermal treatments. **British Poultry Science**, v. 40, n. 2, p. 292-296, 1999.

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**, v. 57 Suppl 11, n., p. 125-132, 2006.

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, n. 6, p. 721-726, 2007.

GOERDT, S.; POLITZ, O.; SCHLEDZEWSKI, K.; BIRK, R.; GRATCHEV, A.; GUILLOT, P.; HAKIY, N.; KLEMKE, C. D.; DIPPEL, E.; KODELJA, V.; ORFANOS, C. E. Alternative versus classical activation of macrophages. **Pathobiology**, v. 67, n. 5-6, p. 222-226, 1999.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature reviews. Immunology**, v. 3, n. 1, p. 23-35, 2003.

GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 593-604, 2010.

GOU, Z.; LIU, R.; ZHAO, G.; ZHENG, M.; LI, P.; WANG, H.; ZHU, Y.; CHEN, J.; WEN, J. Epigenetic modification of TLRs in leukocytes is associated with increased susceptibility to Salmonella enteritidis in chickens. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33627, 2012.

GRAEFF, E. O.; HUNZIKER, M. H.; GRAEFF, F. G. Effects of ipsapirone and BAY R 1531 on learned helplessness. **Brazilian Journal of Medical and Biolical Research**, v. 22, n. 9, p. 1141-1144, 1989.

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

GU, X. H.; HAO, Y.; WANG, X. L. Overexpression of heat shock protein 70 and its relationship to intestine under acute heat stress in broilers: 2. Intestinal oxidative stress. **Poultry Science**, v. 91, n. 4, p. 790-799, 2012.

GULERIA, I.; POLLARD, J. W. Aberrant macrophage and neutrophil population dynamics and impaired Th1 response to Listeria monocytogenes in colony-stimulating factor 1-deficient mice. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1795-1807, 2001.

GUPTA, S.; EARLEY, B.; CROWE, M. A. Pituitary, adrenal, immune and performance responses of mature Holstein x Friesian bulls housed on slatted floors at various space allowances. **Vet J**, v. 173, n. 3, p. 594-604, 2007.

HAGHIGHI, H. R.; ABDUL-CAREEM, M. F.; DARA, R. A.; CHAMBERS, J. R.; SHARIF, S. Cytokine gene expression in chicken cecal tonsils following treatment with probiotics and Salmonella infection. **Veterinary Microbiology**, v. 126, n. 1-3, p. 225-233, 2008.

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

HARTL, F. U. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, v. 381, n. 6583, p. 571-579, 1996.

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

HEIJNEN, C. J.; ROUPPE VAN DER VOORT, C.; WULFFRAAT, N.; VAN DER NET, J.; KUIS, W.; KAVELAARS, A. Functional alpha 1-adrenergic receptors on leukocytes of patients with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 71, n. 1-2, p. 223-226, 1996.

HIRSCH, J. G. Immunity to infectious diseases: review of some concepts of Metchnikoff. **Bacteriological Reviews**, v. 23, n. 2, p. 48-60, 1959.

HODGES, R. D. **The histology of the fowl**. London ; New York: Academic Press, 1974. 648 pp.

HUBEL, K. A. Intestinal nerves and ion transport: stimuli, reflexes, and responses. **The American Journal of Physiology**, v. 248, n. 3 Pt 1, p. G261-271, 1985.

HUGHES, S.; POH, T. Y.; BUMSTEAD, N.; KAISER, P. Re-evaluation of the chicken MIP family of chemokines and their receptors suggests that CCL5 is the prototypic MIP family

chemokine, and that different species have developed different repertoires of both the CC chemokines and their receptors. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 31, n. 1, p. 72-86, 2007.

ICHINOSE, M.; ASAI, M.; IMAI, K.; SAWADA, M. Enhancement of phagocytosis by corticostatin I (CSI) in cultured mouse peritoneal macrophages. **Immunopharmacology**, v. 35, n. 2, p. 103-109, 1996.

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. **European Journal of Immunology**, v. 27, n. 11, p. 2885-2891, 1997.

ISHII, M.; WEN, H.; CORSA, C. A.; LIU, T.; COELHO, A. L.; ALLEN, R. M.; CARSON, W. F. T.; CAVASSANI, K. A.; LI, X.; LUKACS, N. W.; HOGABOAM, C. M.; DOU, Y.; KUNKEL, S. L. Epigenetic regulation of the alternatively activated macrophage phenotype. **Blood**, v. 114, n. 15, p. 3244-3254, 2009.

IWAGAMI, Y. Changes in the ultrastructure of human cells related to certain biological responses under hyperthermic culture conditions. **Human Cell**, v. 9, n. 4, p. 353-366, 1996.

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

JOLESCH, A.; ELMER, K.; BENDZ, H.; ISSELS, R. D.; NOESSNER, E. Hsp70, a messenger from hyperthermia for the immune system. **European Journal of Cell Biology**, v. 91, n. 1, p. 48-52, 2012.

KAISER, P.; WU, Z.; ROTHWELL, L.; FIFE, M.; GIBSON, M.; POH, T. Y.; SHINI, A.; BRYDEN, W.; SHINI, S. Prospects for understanding immune-endocrine interactions in the chicken. **General and Comparative Endocrinology**, v. 163, n. 1-2, p. 83-91, 2009.

KAMWANJA, L. A.; CHASE, C. C., JR.; GUTIERREZ, J. A.; GUERRIERO, V., JR.; OLSON, T. A.; HAMMOND, A. C.; HANSEN, P. J. Responses of bovine lymphocytes to heat shock as modified by breed and antioxidant status. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 2, p. 438-444, 1994.

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

KHAJAVI, M.; RAHIMI, S.; HASSAN, Z. M.; KAMALI, M. A.; MOUSAVI, T. Effect of feed restriction early in life on humoral and cellular immunity of two commercial broiler strains under heat stress conditions. **British Poultry Science**, 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, n. 5, 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**, v., n., p., 2008.

KINCY-CAIN, T.; CLEMENTS, J. D.; BOST, K. L. Endogenous and exogenous interleukin-12 augment the protective immune response in mice orally challenged with Salmonella dublin. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 4, p. 1437-1440, 1996.

KLIMPEL, G. R.; ASUNCION, M.; HAITHCOAT, J.; NIESEL, D. W. Cholera toxin and Salmonella typhimurium induce different cytokine profiles in the gastrointestinal tract. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 3, p. 1134-1137, 1995.

KOHM, A. P.; SANDERS, V. M. Norepinephrine: a messenger from the brain to the immune system. **Immunology Today**, v. 21, n. 11, p. 539-542, 2000.

KORVER, D. R. Overview of the immune dynamics of the digestive system. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 15, n., p. 123-135, 2006.

KRANENDONK, G.; MULDER, E. J.; PARVIZI, N.; TAVERNE, M. A. Prenatal stress in pigs: experimental approaches and field observations. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 116, n. 7, p. 413-422, 2008.

KUHN, R.; LOHLER, J.; RENNICK, D.; RAJEWSKY, K.; MULLER, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, v. 75, n. 2, p. 263-274, 1993.

LAMBERT, G. P. Intestinal barrier dysfunction, endotoxemia, and gastrointestinal symptoms: the 'canary in the coal mine' during exercise-heat stress? **Medicine and Sport Science**, v. 53, n., p. 61-73, 2008.

LAMBERT, G. P. Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 14 Suppl, p. E101-108, 2009.

LAMBERT, G. P.; GISOLFI, C. V.; BERG, D. J.; MOSELEY, P. L.; OBERLEY, L. W.; KREGEL, K. C. Selected contribution: Hyperthermia-induced intestinal permeability and the role of oxidative and nitrosative stress. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 4, p. 1750-1761; discussion 1749, 2002.

LAWRENCE, D. A.; KIM, D. Central/peripheral nervous system and immune responses. **Toxicology**, v. 142, n. 3, p. 189-201, 2000.

LAY, D. C., JR.; FULTON, R. M.; HESTER, P. Y.; KARCHER, D. M.; KJAER, J. B.; MENCH, J. A.; MULLENS, B. A.; NEWBERRY, R. C.; NICOL, C. J.; O'SULLIVAN, N. P.; PORTER, R. E. Hen welfare in different housing systems. **Poultry Science**, v. 90, n. 1, p. 278-294, 2011.

LAZAREVIC, V.; GLIMCHER, L. H. T-bet in disease. **Nature Immunology**, v. 12, n. 7, p. 597-606, 2011.

LAZAREVIC, V.; NOLT, D.; FLYNN, J. L. Long-term control of Mycobacterium tuberculosis infection is mediated by dynamic immune responses. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 2, p. 1107-1117, 2005.

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

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

LIBERMAN, A. C.; REFOJO, D.; DRUKER, J.; TOSCANO, M.; REIN, T.; HOLSBOER, F.; ARZT, E. The activated glucocorticoid receptor inhibits the transcription factor T-bet by direct protein-protein interaction. **FASEB J**, v. 21, n. 4, p. 1177-1188, 2007b.

LICINIO, J.; FROST, P. The neuroimmune-endocrine axis: pathophysiological implications for the central nervous system cytokines and hypothalamus-pituitary-adrenal hormone dynamics. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 10, p. 1141-1148, 2000.

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.

LIN, H.; SUI, S. J.; JIAO, H. C.; BUYSE, J.; DECUYPERE, E. Impaired development of broiler chickens by stress mimicked by corticosterone exposure. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 143, n. 3, 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, n. 4, p. 458-465, 2002.

LIU, G.; YANG, H. Modulation of macrophage activation and programming in immunity. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 3, p. 502-512, 2012.

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

MADDEN, K. S.; FELTEN, D. L. Experimental basis for neural-immune interactions. **Physiological Reviews**, v. 75, n. 1, p. 77-106, 1995.

MADDEN, K. S.; FELTEN, S. Y.; FELTEN, D. L.; HARDY, C. A.; LIVNAT, S. Sympathetic nervous system modulation of the immune system. II. Induction of lymphocyte proliferation and migration in vivo by chemical sympathectomy. **Journal of Neuroimmunology**, v. 49, n. 1-2, p. 67-75, 1994a.

MADDEN, K. S.; FELTEN, S. Y.; FELTEN, D. L.; SUNDARESAN, P. R.; LIVNAT, S. Sympathetic neural modulation of the immune system. I. Depression of T cell immunity in vivo and vitro following chemical sympathectomy. **Brain Behavior and Immunity**, v. 3, n. 1, p. 72-89, 1989.

MADDEN, K. S.; MOYNIHAN, J. A.; BRENNER, G. J.; FELTEN, S. Y.; FELTEN, D. L.; LIVNAT, S. Sympathetic nervous system modulation of the immune system. III. Alterations in T and B cell proliferation and differentiation in vitro following chemical sympathectomy. **Journal of Neuroimmunology**, v. 49, n. 1-2, p. 77-87, 1994b.

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

MALOYAN, A.; PALMON, A.; HOROWITZ, M. Heat acclimation increases the basal HSP72 level and alters its production dynamics during heat stress. **American Journal of Physiology**, v. 276, n. 5 Pt 2, p. R1506-1515, 1999.

MARTINDALE, R. G. Contemporary strategies for the prevention of stress-related mucosal bleeding. **American Journal of Health-system Pharmacy**, v. 62, n. 10 Suppl 2, p. S11-17, 2005.

MARTINEZ, F. O. Regulators of macrophage activation. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 6, p. 1531-1534, 2012.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n., p. 451-483, 2009.

MASHALY, M. M.; HENDRICKS, G. L., 3RD; KALAMA, M. A.; GEHAD, A. E.; ABBAS, A. O.; PATTERSON, P. H. Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. **Poultry Science**, v. 83, n. 6, p. 889-894, 2004.

MASHALY, M. M.; TROUT, J. M.; HENDRICKS, G., 3RD; AL-DOKHI, L. M.; GEHAD, A. The role of neuroendocrine immune interactions in the initiation of humoral immunity in chickens. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 409-422, 1998.

MASSOCO, C.; PALERMO-NETO, J. Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 95, n. 1-2, p. 11-19, 2003.

MCEWEN, B. S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Research**, v. 886, n. 1-2, p. 172-189, 2000.

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

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

MEZQUITA, B.; MEZQUITA, J.; DURFORT, M.; MEZQUITA, C. Constitutive and heat-shock induced expression of Hsp70 mRNA during chicken testicular development and regression. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 82, n. 3, p. 480-490, 2001.

MITCHELL, M. A.; CARLISLE, A. J. The effects of chronic exposure to elevated environmental temperature on intestinal morphology and nutrient absorption in the domestic fowl (Gallus domesticus). **Comp Biochem Physiol A Comp Physiol**, v. 101, n. 1, p. 137-142, 1992.

MORRISSEY, P. J.; CHARRIER, K.; VOGEL, S. N. Exogenous tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 alpha increase resistance to Salmonella typhimurium: efficacy is influenced by the Ity and Lps loci. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 8, p. 3196-3198, 1995.

MORROW-TESCH, J. L.; MCGLONE, J. J.; SALAK-JOHNSON, J. L. Heat and social stress effects on pig immune measures. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 10, p. 2599-2609, 1994.

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, n. 2, p. 364-371, 2007.

MURRAY, P. J.; WYNN, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 11, p. 723-737, 2011.

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

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

NATHAN, C. F.; ROOT, R. K. Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages: dependence on sequential activation and triggering. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 146, n. 6, p. 1648-1662, 1977.

NAUCIEL, C.; ESPINASSE-MAES, F. Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to Salmonella typhimurium infection. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 2, p. 450-454, 1992.

OTTAVIANI, E.; FRANCHINI, A.; FRANCESCHI, C. Pro-opiomelanocortin-derived peptides, cytokines, and nitric oxide in immune responses and stress: an evolutionary approach. **International Review of Cytology**, v. 170, n., p. 79-141, 1997.

OUYANG, W.; RUTZ, S.; CRELLIN, N. K.; VALDEZ, P. A.; HYMOWITZ, S. G. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n., p. 71-109, 2010.

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, n. 3, p. 435-440, 2008.

PALERMO-NETO, J.; SANTOS, F. A.; GUERRA, J. L.; SANTOS, G. O.; PINHEIRO, S. R. Glue solvent inhalation impairs host resistance to Mycobacterium bovis-induced infection in hamsters. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 43, n. 1, p. 1-5, 2001.

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

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, 2001b.

PALMISANO, A. N.; WINTON, J. R.; DICKHOFF, W. W. Sequence features and phylogenetic analysis of the stress protein hsp90alpha in chinook salmon (Oncorhynchus tshawytscha), a poikilothermic vertebrate. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 258, n. 3, p. 784-791, 1999.

PEREZ, A. R.; BOTTASSO, O.; SAVINO, W. The impact of infectious diseases upon neuroendocrine circuits. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 2, p. 96-105, 2009.

PEREZ, A. R.; ROGGERO, E.; NICORA, A.; PALAZZI, J.; BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A.; BOTTASSO, O. A. Thymus atrophy during Trypanosoma cruzi infection is caused by an immuno-endocrine imbalance. **Brain Behav Immun**, v. 21, n. 7, p. 890-900, 2007.

PESTKA, S.; KRAUSE, C. D.; WALTER, M. R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. **Immunological Reviews**, v. 202, n., p. 8-32, 2004.

PORTELA CDE, P.; MASSOCO CDE, O.; DE LIMA, W. T.; PALERMO-NETO, J. Stress-induced increment on total bronchoalveolar cell count in OVA-sensitized rats. **Physiol Behav**, v. 72, n. 3, 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.

PROSSER, C.; STELWAGEN, K.; CUMMINS, R.; GUERIN, P.; GILL, N.; MILNE, C. Reduction in heat-induced gastrointestinal hyperpermeability in rats by bovine colostrum and goat milk powders. **Journal of Applied Physiology**, v. 96, n. 2, p. 650-654, 2004.

QUINTEIRO-FILHO, W. M.; GOMES, A. V.; PINHEIRO, M. L.; RIBEIRO, A.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; FERREIRA, A. J.; PALERMO-NETO, J.

Heat stress impairs performance and induces intestinal inflammation in broiler chickens infected with Salmonella Enteritidis. **Avian Pathology**, v., n., p., 2012a.

QUINTEIRO-FILHO, W. M.; RIBEIRO, A.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; PINHEIRO, M. L.; SAKAI, M.; SA, L. R.; FERREIRA, A. J.; PALERMO-NETO, J. Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 89, n. 9, p. 1905-1914, 2010.

QUINTEIRO-FILHO, W. M.; RIGHI, D. A.; PALERMO-NETO, J. Effect of cyhalothrin on Ehrlich tumor growth and macrophage activity in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 10, p. 912-917, 2009.

QUINTEIRO-FILHO, W. M.; RODRIGUES, M. V.; RIBEIRO, A.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; PINHEIRO, M. L.; SA, L. R.; FERREIRA, A. J.; PALERMO-NETO, J. Acute heat stress impairs performance parameters and induces mild intestinal enteritis in broiler chickens: role of acute HPA axis activation. **Journal of Animal Science**, v., n., p., 2012b.

QURESHI, M. A. Avian macrophage and immune response: an overview. **Poultry Science**, v. 82, n. 5, p. 691-698, 2003.

QURESHI, M. A.; HEGGEN, C. L.; HUSSAIN, I. Avian macrophage: effector functions in health and disease. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 24, n. 2-3, p. 103-119, 2000.

REICHLIN, S. Neuroendocrine-immune interactions. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 17, p. 1246-1253, 1993.

REUL, J. M.; LABEUR, M. S.; WIEGERS, G. J.; LINTHORST, A. C. Altered neuroimmunoendocrine communication during a condition of chronically increased brain corticotropin-releasing hormone drive. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 840, n., p. 444-455, 1998.

REVOLLEDO, L.; FERREIRA, C. S.; FERREIRA, A. J. Prevention of Salmonella Typhimurium colonization and organ invasion by combination treatment in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 88, n. 4, p. 734-743, 2009.

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

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

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

RIDDELL, C. **Avian Histophatology**. Lawrence, Kansas: American Association of Avian Phatologists, Allen Press Inc., 1987. 152 p.

RIGHI, D. A.; PALERMO-NETO, J. Behavioral effects of type II pyrethroid cyhalothrin in rats. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 191, n. 2, p. 167-176, 2003.

RIGHI, D. A.; PALERMO-NETO, J. Effects of type II pyrethroid cyhalothrin on peritoneal macrophage activity in rats. **Toxicology**, v. 212, n. 2-3, p. 98-106, 2005.

RIGHI, D. A.; PINHEIRO, S. R.; GUERRA, J. L.; PALERMO-NETO, J. Effects of diazepam on Mycobacterium bovis-induced infection in hamsters. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 9, p. 1145-1153, 1999.

RIGHI, D. A.; XAVIER, F. G.; PALERMO-NETO, J. Effects of type II pyrethroid cyhalothrin on rat innate immunity: a flow cytometric study. **Int Immunopharmacol**, v. 9, n. 1, p. 148-152, 2009.

ROOT, R. K.; METCALF, J.; OSHINO, N.; CHANCE, B. H2O2 release from human granulocytes during phagocytosis. I. Documentation, quantitation, and some regulating factors. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 55, n. 5, p. 945-955, 1975.

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

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.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 1, p. 55-89, 2000.

SCHRODER, K.; HERTZOG, P. J.; RAVASI, T.; HUME, D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 2, p. 163-189, 2004.

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

SELEDTSOV, V. I.; SELEDTSOVA, G. V. A balance between tissue-destructive and tissue-protective immunities: a role of toll-like receptors in regulation of adaptive immunity. **Immunobiology**, v. 217, n. 4, p. 430-435, 2012.

SELL, K. M.; CROWE, S. F.; KENT, S. Lipopolysaccharide induces biochemical alterations in chicks trained on the passive avoidance learning task. **Physiology & Behavior**, v. 78, n. 4-5, p. 679-688, 2003.

SEVI, A.; TAIBI, L.; ALBENZIO, M.; MUSCIO, A.; DELL'AQUILA, S.; NAPOLITANO, F. Behavioral, adrenal, immune, and productive responses of lactating ewes to regrouping and relocation. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 6, p. 1457-1465, 2001.

SHARKEY, K. A.; MAWE, G. M. Neuroimmune and epithelial interactions in intestinal inflammation. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, n. 6, p. 669-677, 2002.

SHINI, S.; HUFF, G. R.; SHINI, A.; KAISER, P. Understanding stress-induced immunosuppression: exploration of cytokine and chemokine gene profiles in chicken peripheral leukocytes. **Poultry Science**, v. 89, n. 4, p. 841-851, 2010.

SHINI, S.; KAISER, P.; SHINI, A.; BRYDEN, W. L. Biological response of chickens (Gallus gallus domesticus) induced by corticosterone and a bacterial endotoxin. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 149, n. 2, p. 324-333, 2008a.

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

SHIVAPRASAD, H. L. Fowl typhoid and pullorum disease. **Rev Sci Tech**, v. 19, n. 2, p. 405-424, 2000.

SIFRI, M. Informal Nutrition Symposium: Dynamics of the digestive system- Introduction. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 15, n., p. 122, 2006.

SINGLETON, K. D.; WISCHMEYER, P. E. Oral glutamine enhances heat shock protein expression and improves survival following hyperthermia. **Shock**, v. 25, n. 3, p. 295-299, 2006.

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

SOLEIMANI, A. F.; ZULKIFLI, I.; HAIR-BEJO, M.; OMAR, A. R.; RAHA, A. R. The role of heat shock protein 70 in resistance to Salmonella enteritidis in broiler chickens subjected to neonatal feed restriction and thermal stress. **Poultry Science**, v. 91, n. 2, p. 340-345, 2012.

SONG, Z.; LIU, L.; SHEIKHAHMADI, A.; JIAO, H.; LIN, H. Effect of heat exposure on gene expression of feed intake regulatory peptides in laying hens. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2012, n., p. 484869, 2012.

ST PAUL, M.; BRISBIN, J. T.; ABDUL-CAREEM, M. F.; SHARIF, S. Immunostimulatory properties of Toll-like receptor ligands in chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. in press, n., p., 2013.

STANKEVICIUS, D.; RODRIGUES-COSTA, E. C.; CAMILO FLORIO, J.; PALERMO-NETO, J. Neuroendocrine, behavioral and macrophage activity changes induced by picrotoxin effects in mice. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 2, p. 300-308, 2008.

TACHIBANA, T.; OIKAWA, D.; TAKAHASHI, H.; BOSWELL, T.; FURUSE, M. The anorexic effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone is mediated by corticotrophin-releasing factor in chicks. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 147, n. 1, p. 173-178, 2007.

TAVANO, F.; DI MOLA, F. F.; LATIANO, A.; PALMIERI, O.; BOSSA, F.; VALVANO, M. R.; LATIANO, T.; ANNESE, V.; ANDRIULLI, A.; DI SEBASTIANO, P. Neuroimmune interactions in patients with inflammatory bowel diseases: disease activity and clinical behavior based on Substance P serum levels. **Journal of Crohn's & Colitis**, v. 6, n. 5, p. 563-570, 2012.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009, v.1. 608 p.

TRIPP, C. S.; WOLF, S. F.; UNANUE, E. R. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 8, p. 3725-3729, 1993.

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, n. 6, p. 370-376, 1999.

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, n. 11, p. 1694-1698, 1994.

UBABEF. **Relatório Anual 2012.** São Paulo: União Brasileira de Avicultura, p.1-57
VAN DIJK, A.; VELDHUIZEN, E. J.; HAAGSMAN, H. P. Avian defensins. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 124, n. 1-2, p. 1-18, 2008.

VIEIRA, O. V.; BOTELHO, R. J.; GRINSTEIN, S. Phagosome maturation: aging gracefully. **The Biochemical journal**, v. 366, n. Pt 3, p. 689-704, 2002.

WALLIS, T. S.; GALYOV, E. E. Molecular basis of Salmonella-induced enteritis. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 997-1005, 2000.

WALLIS, T. S.; WOOD, M.; WATSON, P.; PAULIN, S.; JONES, M.; GALYOV, E. Sips, Sops, and SPIs but not stn influence Salmonella enteropathogenesis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 473, n., p. 275-280, 1999.

WANG, S.; EDENS, F. W. Heat-stress response of broiler cockerels to manipulation of the gonadal steroids, testosterone and estradiol. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 106, n. 3, p. 629-633, 1993.

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. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 95, n. 6, p. 2945-2953, 1995.

WEBSTER, J. I.; TONELLI, L.; STERNBERG, E. M. Neuroendocrine regulation of immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 20, n., p. 125-163, 2002.

WEBSTER MARKETON, J. I.; GLASER, R. Stress hormones and immune function. **Cellular Immunology**, v. 252, n. 1-2, p. 16-26, 2008.

WHYTE, C. S.; BISHOP, E. T.; RUCKERL, D.; GASPAR-PEREIRA, S.; BARKER, R. N.; ALLEN, J. E.; REES, A. J.; WILSON, H. M. Suppressor of cytokine signaling (SOCS)1 is a key determinant of differential macrophage activation and function. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, n. 5, p. 845-854, 2012.

YAHAV, S.; SHAMAY, A.; HOREV, G.; BAR-ILAN, D.; GENINA, O.; FRIEDMAN-EINAT, M. Effect of acquisition of improved thermotolerance on the induction of heat shock proteins in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 76, n. 10, p. 1428-1434, 1997.

ZENG, H.; CARLSON, A. Q.; GUO, Y.; YU, Y.; COLLIER-HYAMS, L. S.; MADARA, J. L.; GEWIRTZ, A. T.; NEISH, A. S. Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic Salmonella. **Journal of Immunology**, v. 171, n. 7, p. 3668-3674, 2003.

ZHANG, Z. Y.; JIA, G. Q.; ZUO, J. J.; ZHANG, Y.; LEI, J.; REN, L.; FENG, D. Y. Effects of constant and cyclic heat stress on muscle metabolism and meat quality of broiler breast fillet and thigh meat. **Poultry Science**, v. 91, n. 11, p. 2931-2937, 2012.

ZHAO, G.; ZHOU, S.; DAVIE, A.; SU, Q. Effects of moderate and high intensity exercise on T1/T2 balance. **Exercise Immunology Review**, v. 18, n., p. 98-114, 2012.

ZHEN, F. S.; DU, H. L.; XU, H. P.; LUO, Q. B.; ZHANG, X. Q. Tissue and allelic-specific expression of hsp70 gene in chickens: basal and heat-stress-induced mRNA level quantified with real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. **British Poultry Science**, v. 47, n. 4, p. 449-455, 2006.

ZORRILLA, E. P.; LUBORSKY, L.; MCKAY, J. R.; ROSENTHAL, R.; HOULDIN, A.; TAX, A.; MCCORKLE, R.; SELIGMAN, D. A.; SCHMIDT, K. The relationship of depression and stressors to immunological assays: a meta-analytic review. **Brain Behavior and Immunity**, v. 15, n. 3, p. 199-226, 2001.

ZULKIFLI, I.; ABDULLLAH, N.; AZRIN, N. M.; HO, Y. W. Growth performance and immune response of two commercial broiler strains fed diets containing Lactobacillus cultures and oxytetracycline under heat stress conditions. **British Poultry Science**, v. 41, n. 5, p. 593-597, 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Tabela 16 – Avaliação histopatológica semiquantitativa do duodeno de frangos de corte submetidos ou não a estresse por calor (31±1°C) e infectados ou não por *Salmonella enteritidis*

AMOSTRA	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
E1	0	0	1	1	1	1	0	2	HS31°C
E2	0	0	1	1	1	1	0	1	HS31°C
E3	0	0	1	1	1	0	0	1	HS31°C
E4	0	0	1	1	1	1	0	1	HS31°C
E5	0	0	1	1	1	0	0	1	HS31°C
E6	0	1	1	0	0	0	0	1	HS31°C
E7	0	0	1	1	1	1	0	1	HS31°C
E8	0	0	1	1	1	1	0	1	HS31°C
E9	0	0	1	0	0	0	0	1	HS31°C
E10	0	0	1	0	0	0	0	1	HS31°C
E11	0	0	1	1	1	1	0	1	PC
E12	0	0	1	1	1	1	0	1	PC
E13	0	0	1	1	0	0	0	1	PC
E14	0	0	1	1	1	1	0	2	PC
E15	1	1	1	0	0	0	0	1	PC
E16	0	0	1	1	1	1	0	1	PC
E17	0	0	1	1	1	1	0	1	PC
E18	0	0	1	0	0	0	0	1	PC
E19	0	0	1	0	0	0	0	1	PC
E20	0	0	1	1	1	1	0	1	PC
E21	0	0	1	2	2	2	0	1	PHS31°C
E22	0	0	1	2	2	2	0	1	PHS31°C
E23	0	0	1	2	2	2	0	1	PHS31°C
E24	0	0	1	2	2	2	0	1	PHS31°C
E25	0	1	1	1	1	2	0	1	PHS31°C
E26	0	0	1	2	2	1	0	2	PHS31°C
E27	0	1	1	1	1	1	0	2	PHS31°C
E28	0	0	1	2	2	1	0	1	PHS31°C
E29	0	0	1	2	2	1	0	1	PHS31°C
E30	0	1	1	2	2	1	0	1	PHS31°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 17 – Avaliação histopatológica semiquantitativa do jejuno de frangos de corte submetidos ou não a estresse por calor (31±1°C) e infectados ou não por *Salmonella enteritidis*

AMOSTRA	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
E1	0	0	1	1	1	1	0	1	HS31°C
E2	0	0	1	1	1	1	0	1	HS31°C
E3	0	0	1	1	1	1	0	1	HS31°C
E4	0	0	1	0	0	0	0	1	HS31°C
E5	0	0	1	1	1	1	0	1	HS31°C
E6	0	0	1	1	1	1	0	1	HS31°C
E7	0	0	1	1	1	1	0	1	HS31°C
E8	0	0	1	0	0	0	0	1	HS31°C
E9	0	0	1	1	1	0	0	1	HS31°C
E10	0	0	1	0	0	0	0	1	HS31°C
E11	0	0	1	2	2	1	0	1	PC
E12	0	0	1	1	1	1	0	1	PC
E13	0	0	1	1	0	0	0	1	PC
E14	0	0	1	1	1	1	0	2	PC
E15	0	0	1	0	0	0	0	1	PC
E16	0	0	1	1	1	1	0	1	PC
E17	0	0	1	2	2	1	0	1	PC
E18	0	0	1	0	0	0	0	1	PC
E19	0	0	1	0	0	0	0	1	PC
E20	0	0	1	1	1	1	0	1	PC
E21	0	0	1	2	2	2	0	1	PHS31°C
E22	0	0	1	2	2	2	0	1	PHS31°C
E23	0	0	1	1	1	2	0	1	PHS31°C
E24	0	0	1	2	2	2	0	1	PHS31°C
E25	0	0	1	2	2	1	0	1	PHS31°C
E26	0	1	1	2	2	1	0	1	PHS31°C
E27	0	1	1	2	2	1	0	1	PHS31°C
E28	0	0	1	2	2	1	0	1	PHS31°C
E29	0	0	1	1	2	1	0	1	PHS31°C
E30	0	0	1	1	1	1	0	1	PHS31°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 18 – Avaliação histopatológica semiquantitativa do íleo de frangos de corte submetidos ou não a estresse por calor (31±1°C) e infectados ou não por *Salmonella enteritidis*

AMOSTRA	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
E1	0	0	1	1	1	1	0	1	HS31°C
E2	0	0	1	1	1	1	0	1	HS31°C
E3	0	0	1	0	0	0	0	1	HS31°C
E4	0	0	1	1	1	1	0	1	HS31°C
E5	0	0	1	0	0	0	0	1	HS31°C
E6	0	1	1	1	1	1	0	1	HS31°C
E7	0	0	1	1	1	1	0	1	HS31°C
E8	0	0	1	0	0	0	0	1	HS31°C
E9	0	0	1	2	2	1	0	1	HS31°C
E10	0	0	1	1	1	1	0	1	HS31°C
E11	0	0	1	0	0	0	0	1	PC
E12	0	0	1	1	1	1	0	1	PC
E13	0	0	1	1	1	1	0	1	PC
E14	0	0	1	1	1	1	0	1	PC
E15	0	0	1	2	2	2	0	1	PC
E16	0	0	1	0	0	0	0	1	PC
E17	0	0	1	1	1	1	0	1	PC
E18	0	0	1	0	0	0	0	1	PC
E19	0	0	1	1	1	1	0	1	PC
E20	0	1	1	1	1	1	0	1	PC
E21	0	0	1	1	1	2	0	1	PHS31°C
E22	0	0	1	2	2	2	0	1	PHS31°C
E23	0	0	1	2	2	2	0	1	PHS31°C
E24	0	0	1	2	2	2	0	1	PHS31°C
E25	0	0	1	2	2	2	0	1	PHS31°C
E26	0	0	1	1	1	1	0	1	PHS31°C
E27	0	0	1	2	2	1	0	1	PHS31°C
E28	0	0	1	2	2	2	0	1	PHS31°C
E29	0	0	1	2	2	1	0	1	PHS31°C
E30	0	1	1	2	2	2	0	2	PHS31°C

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

ANEXOS

ANEXO A

Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens

W. M. Quinteiro-Filho,* A. Ribeiro,* V. Ferraz-de-Paula,* M. L. Pinheiro,* M. Sakai,* L. R. M. Sá,† A. J. P. Ferreira,‡ and J. Palermo-Neto*[1]

Neuroimmunomodulation Research Group, †Laboratory of Experimental and Comparative Gastroenterology, Department of Pathology, and ‡Laboratory of Ornitopathology, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, CEP 05508-900, Brazil

ABSTRACT Studies on environmental consequences of stress on animal production have grown substantially in the last few years for economic and animal welfare reasons. Physiological, hormonal, and immunological deficits as well as increases in animals' susceptibility to diseases have been reported after different stressors in broiler chickens. The aim of the current experiment is to describe the effects of 2 different heat stressors (31 ± 1 and 36 ± 1°C/10 h per d) applied to broiler chickens from d 35 to 42 of life on the corticosterone serum levels, performance parameters, intestinal histology, and peritoneal macrophage activity, correlating and discussing the obtained data under a neuroimmune perspective. In our study, we demonstrated that heat stress (31 ± 1 and 36 ± 1°C) increased the corticosterone serum levels and decreased BW gain and food intake. Only chickens submitted to 36 ± 1°C, however, presented a decrease in feed conversion and increased mortality. We also showed a decrease of bursa of Fabricius (31 ± 1 and 36 ± 1°C), thymus (36 ± 1°C), and spleen (36 ± 1°C) relative weights and of macrophage basal (31 ± 1 and 36 ± 1°C) and *Staphylococcus aureus*-induced oxidative burst (31 ± 1°C). Finally, mild multifocal acute enteritis characterized by an increased presence of lymphocytes and plasmocytes within the jejunum's lamina propria was also observed. The stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation was taken as responsible for the negative effects observed on the chickens' performance and immune function and also the changes of the intestinal mucosa. The present obtained data corroborate with others in the field of neuroimmunomodulation and open new avenues for the improvement of broiler chicken welfare and production performance.

Key words: heat stress, corticosterone, macrophage, small intestine, hypothalamic-pituitary-adrenal axis

2010 Poultry Science 89:1905–1914
doi:10.3382/ps.2010-00812

INTRODUCTION

Reports on the mutual influences between the central nervous system and the immune system exist in much of the extant literature. Over the past decades, this area of knowledge has grown more organized, leading to the fields referred to as neuroimmunomodulation (NIM), psychoneuroimmunology, and immunoneuroendocrinology, among others.

Ever since Selye's pioneering study in 1936 (Selye, 1998), the literature on the subject has been flooded by reports ascribing phenomena to neuroimmune interactions in health and disease, both for changes in brain activity and behavior induced by peripheral immune stimuli or reactions (Besedovsky et al., 1975, 1983; Besedovsky and Sorkin, 1977; Blalock, 1984; Basso et al., 2004) and for the influence of stressors and brain activity on immunity (Ader and Cohen, 1975; Irwin et al., 1990; Madden and Felten, 1995; Miller, 1998; Palermo-Neto et al., 2003). Thus, a fixed-effect analysis showed that both conditions are associated with 1) increases in hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activity and elevation in serum corticosterone (Costa-Pinto and Palermo-Neto, 2010), 2) overall leukocytosis, 3) mild reductions in absolute natural killer (NK) cell counts and relative T-cell proportions, 4) marginal increases in CD4+:CD8+ ratios, and 5) moderate decreases in T-cell and NK-cell function (Zorrilla et al., 2001). Accordingly, studies on NIM conducted with laboratory animals showed that 1) foot-shock stress induces behavioral signs in mice indicative of anxiety and stress and decreases both macrophage activity and animal host resistance to Ehrlich tumor growth (Palermo-Neto et al., 2003); 2) individual housing of mice increases HPA axis activity, corticosterone serum levels, and hypothalamic noradrenaline levels and turnover and decreases mac-

©2010 Poultry Science Association Inc.
Received March 29, 2010.
Accepted June 6, 2010.
[1]Corresponding author: jpalermo@usp.br

rophage activity and animal resistance to tumor growth (Palermo-Neto et al., 2008); 3) submissive mice display anxiety-like behaviors and present decreased innate immune responses (Sá-Rocha et al., 2006); and 4) stress of cohabitation with a sick partner decreases macrophage and peripheral blood neutrophil activity in mice (Alves et al., 2006, 2007).

The data gleaned from numerous clinical and experimental reports constitute unequivocal evidence supporting the biological relevance of NIM interactions in health and disease. Despite this, however, very few works have discussed NIM in farm animals, especially in poultry (Marsh and Scanes, 1994; Mashaly et al., 1998). In fact, stress is known to present biphasic effects in animals. Low levels of stress (eustress) might improve immune function and production indexes. On the other hand, strong and long-lasting stressors (distress) decreased farm animals' welfare, health status, and production indexes.

Public concern regarding farm animal well-being has skyrocketed in the past few years. Many countries presently have laws and welfare codes protecting farm animals, including poultry, from distress and fear (Main et al., 2009; Bonafos et al., 2010). Yet, these stressor effects, although thoroughly analyzed, were scarcely correlated and discussed under a neuroimmune perspective. Thus, concerning the effects of heat stress on avian species, the following findings were reported: 1) decreases in the feed consumption, BW gain, as well as the total white blood cell count and antibody production (Mashaly et al., 2004); 2) decreases in the number of peripheral blood lymphocytes and induction of an electrolyte imbalance (Borges et al., 2004); 3) decreases in the blood lymphocytes and spleen weight (Trout and Mashaly, 1994); 4) decreases in the feed conversion and intake, in the BW gain, and in macrophage activity (Bartlett and Smith, 2003); 5) decreases in CD4+ and CD8+ lymphocytes and antibody production against SRBC (Khajavi et al., 2003); 6) decreases in food intake, growth rates, the intestinal villi heights, and the wet and dry weights of jejunum (Mitchell and Carlisle, 1992).

Taking these factors into consideration and being cognizant of the economic effect of heat stress in tropical and subtropical poultry production, we decided to design the present experiment to analyze, under a neuroimmune perspective, the effects of a long-term, experimentally induced heat stress [31 ± 1°C (**HS31°C**) and 36 ± 1°C (**HS36°C**) from d 35 to 42 of life] on the production performance, corticosterone serum levels, peritoneal macrophage activity, and intestinal histology of broiler chickens.

MATERIALS AND METHODS

Birds and Group Formation

One-day-old broiler chickens were housed in environment-controlled rooms at the Experimental Center of Avian Pathology, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo. A total of 360 male broiler chickens, from 1 to 42 d old, were used. Birds were obtained from a commercial hatchery and were housed in floor pens covered with sterilized and contaminant-free wood shavings with 10 birds/m^2 and with water and food (hanging feeders) provided ad libitum. The broiler chickens were constantly observed for health status and behavior. The birds were maintained and used in accordance with the guidelines of the Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources of the School of Veterinary Medicine, University of São Paulo.

From d 1 to 35 of life (experimental day, **ED**), the birds were maintained in a recommended environmental temperature (33 ± 1°C from ED1 to ED7, 28 ± 1°C from ED7 to ED21, and 24 ± 1°C from ED21 to ED35). On ED34, the broiler chickens were weighed and reallocated into 3 different groups: a control (**C**) group and 2 independent heat-stressed groups. From ED35 to ED42, broilers of the C group were kept under an environmental temperature of 21 ± 1°C for the entire day. Chickens of the 2 heat-stressed groups were maintained under environmental temperatures of 31 ± 1 and 36 ± 1°C. The heat stress was applied once daily (from 0800 to 1800 h = 10 h/d) during the 6 ED (ED35 to ED41). From 1800 to 0800 h, the environmental temperature of the heat-stressed groups was reduced to 21 ± 1°C (i.e., equal to that of the C group). On ED42, birds were euthanized and the experimental procedures were realized.

Performance Parameters

Broiler chicken performance was assessed through mortality rate, BW gain, feed consumption per bird, and feed conversion. The feed conversion ratio was calculated on the basis of feed:gain for each replicate. For each group of birds, 5 replications with 12 birds per box were made. Data were collected during the experimental period (ED35 to ED42).

Organ Harvest

On ED42 immediately after weighing, 10 birds per group were randomly selected and euthanized by cervical dislocation. At necropsy, lymphoid organs (thymus, spleen, and bursa of Fabricius) were then harvested for relative weight determinations; connective tissue was taken off before weight. The small intestine was also harvested (duodenum, jejunum, and ileum), and it was fixed in a 10% neutral-buffered formalin solution for histological analysis.

Intestinal Morphology

Specimens for light microscopy were taken from several sites of small bowel segments. The intestinal segments were defined based on anatomic limits as follows: the length of the duodenum [from the gizzard

(duodenum ostium) to the beginning of the mesentery (duodenum loop), the length of the jejunum (from the most distal point of insertion of mesentery to 5 cm before Meckel's diverticulum), and the length of the ileum (from 5 cm after Meckel's diverticulum to the ileocecal junction). Tissues were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, cut to 4 to 5 μm thick, and routinely stained with hematoxylin and eosin for light microscopy. All slides were examined for pathological changes by 2 different pathologists that were blinded to the group affiliation; a high positive correlation (r = 0.96) was found between their evaluation.

The histological parameters analyzed were as follows: villus height, crypt morphology and depth, villus height:crypt depth ratio, intensity and composition of inflammatory infiltrate in the lamina propria, and number of intraepithelial lymphocytes per 100 enterocytes. The intensity of small intestinal lesions was semiquantitatively scored from 0 to 3, where 0 = control material; 1 = mild alteration; 2 = moderate alteration; and 3 = severe alteration. The normal histological criteria used were defined by Hodges (1974) and Riddell (1987).

Serum Corticosterone Determination

Twelve broilers per group were randomly selected, and 2 mL of blood was drawn from their brachial veins. Whole blood was used to collect the serum for corticosterone assays. Corticosterone serum levels were determined by RIA using an ImmunoChem Double Antibody Corticosterone ^{125}I RIA Kit (MP Biomedicals LLC, Orangeburg, NY) as described previously by Washburn et al. (2002). To decrease data variability of serum corticosterone levels, C and experimental birds were alternated for euthanasia and their blood was taken at the same time of the day (i.e., between 0800 and 1000 h).

Peritoneal Macrophage Activity

Because chickens do not present resident peritoneal macrophages, activation was performed as proposed by Qureshi et al. (1986) and Morgulis et al. (1999). Briefly, 3% Sephadex G-50 Fine (Sigma, St. Louis, MO) in 0.9% saline solution was injected at the dose of 5 mL/200 g of BW into the peritoneal cavity of 12 chickens from each group (C, HS31°C, and HS36°C) on ED40. Forty-eight hours after the inoculation (ED42), the birds were killed by cervical dislocation and cells were obtained from the peritoneal cavity by lavage with cold RPMI-1640 medium with the help of a plastic syringe (Morgulis et al., 1999). Collected cells were transferred to a 15-mL plastic tube and were kept in an ice bath to hamper cell adhesion. An aliquot of these cells was diluted (1:20) in 5% trypan blue staining and counted using a hemacytometer. Cells were then adjusted to 2×10^6 cells/mL with RPMI-1640, being incubated with 2′,7′-dichlorofluorescein diacetate (**DCFH-DA**), DCFH-DA + propidium iodide (**PI**)-labeled *Staphylococcus aureus* (**SAPI**), and SAPI. Thirty minutes after incubation at 41°C under agitation (to avoid cell adhesion), the samples were centrifuged (500 × *g*/6 min at 4°C) and the obtained cells were resuspended once in 100 μL of cold PBS for cytometric analysis.

Cytometry calibration was performed using sample cells free from incubation staining. Values above 10^1 log were considered to indicate basal cell fluorescence (Figure 1D).

Macrophage Phenotype

Peritoneal macrophage phenotype was used to accurately characterize the cell population corresponding to macrophages. For that, a monoclonal antibody KUL01-PE (Abcam, Cambridge, MA) was employed according to the manufacturer's instructions; KUL01 is a specific antibody for the monocytes and macrophages of avian species (Mast et al., 1998). The peritoneal lavage fluids were incubated with KUL01 for 30 min and subsequently analyzed using flow cytometry.

Peritoneal Macrophage Activity Measurement

A flow cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) interfaced with a Macintosh G4 computer (Apple, Cupertino, CA) was used. Data from 5,000 events were collected in list mode and analyzed in Cell Quest (Becton Dickinson Immunocytometry Systems). Cell populations, which were identified based on their properties on forward scatter-side scatter plots, were mechanically sorted (FACScan, Becton Dickinson Immunocytometry Systems) and were evaluated through light microscopy after staining in Giemsa. The macrophage population was confirmed by the KUL01 phenotype method described previously. Data from peritoneal macrophages were collected, applying gates that sorted out lymphocyte and monocyte clusters. Fluorescence data were collected on a log scale. Green fluorescence from DCFH-DA was measured at 530 ± 30 nm (FL1 detector), and red fluorescence from SAPI was measured at 585 ± 42 nm (FL2). The PI and DCFH-DA fluorescence were analyzed after fluorescence compensation to correct for any crossover between the PI and DCFH-DA signals.

Quantification of phagocytosis and oxidative burst were estimated by mean PI and DCFH-DA fluorescence cells, respectively. Briefly, peritoneal macrophages (2×10^6 cells/mL) collected as described above were mixed with 200 μL of DCFH-DA (0.3 m*M*) in PBS and 100 μL of SAPI in polypropylene tubes (1,000 bacteria:1 macrophage). Samples were incubated under agitation at 37°C for 30 min. Reactions were stopped by adding 2 mL of cold EDTA solution (3 m*M*) to stop phagocytosis. Samples were then centrifuged (250 × *g* for 10 min), and the cell pellets obtained were resuspended

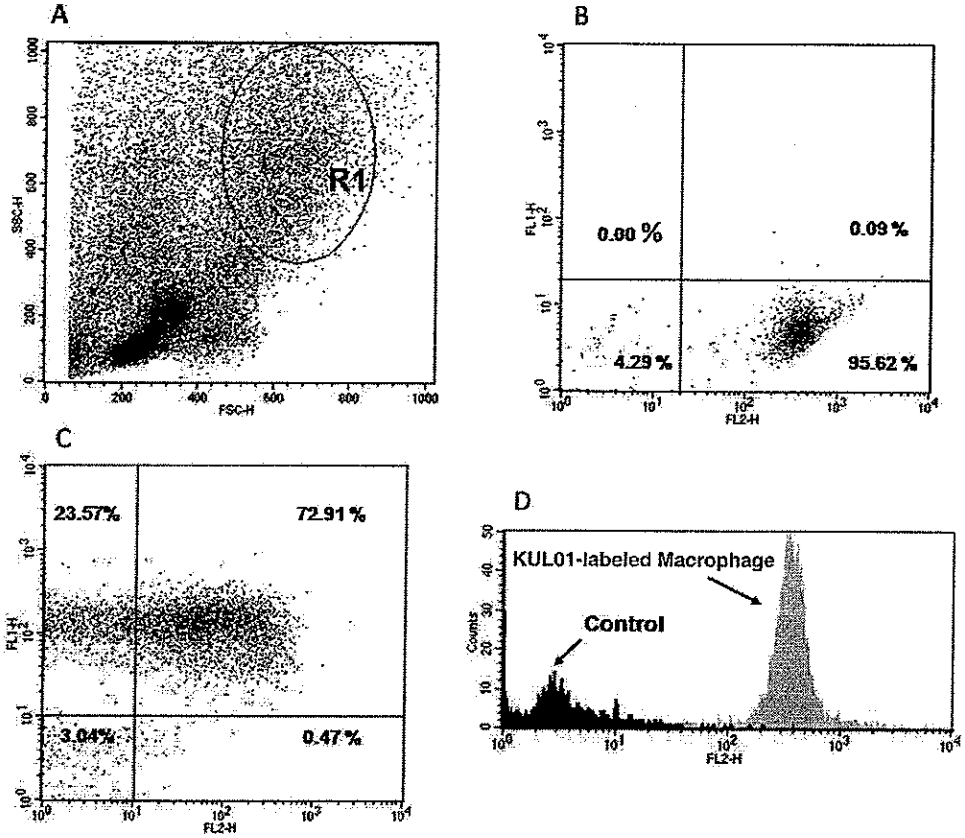


Figure 1. Representative dot plots and histogram used in the analyses of peritoneal macrophage activity. A) Typical side scatter (SSC) and forward scatter (FSC) cytogram of peritoneal lavage fluid from broiler chicken and gate of macrophage population at R1. B) Dot plot of specific monoclonal antibodies KUL01-PE (FL2-H)-labeled macrophages. C) Dot plot of 2′,7′-dichlorofluorescein diacetate (FL1-H) versus propidium iodide-labeled *Staphylococcus aureus* (FL2-H) double-labeled macrophage. D) Overlay histogram of control and KUL01-labeled macrophages. FL--H = fluorescein isothiocyanate fluorescence, FL2-H = phycoerythrin fluorescence.

in 0.5 mL of ice-cold PBS for flow cytometry. Direct measurements of mean fluorescence on green and red channels were recorded as oxidative burst and phagocytosis, respectively, as proposed by Hasui and collaborators (Hasui et al., 1989). The percentage of phagocytosis (percentage of macrophages that ingested bacteria) was expressed as the number of macrophages with red fluorescence divided by the total number of cells (multiplied by 100). The intensity of phagocytosis (quantity of ingested bacteria) was measured directly through the intensity of fluorescence emitted by the cells that performed phagocytosis.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) throughout. Parametric data were analyzed using 1-way ANOVA followed by Dunnett's test. Nonparametric data were analyzed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test. Mortality data were analyzed by log-rank (Mantel-Cox) test. The probability of $P < 0.05$ was considered to show a significant difference for all comparisons made. Data are presented as the mean ± SEM.

RESULTS

Performance Parameters

All performance parameters were severely affected in chickens submitted once daily (10 h/d) from ED35 to ED42 to stressors of HS31°C and HS36°C (Table 1). Both stressors decreased the BW gain ($P < 0.01$) and the food consumption (g/bird; $P < 0.01$). However, only broilers of the HS36°C group presented an increase in feed conversion ($P < 0.01$). There was no mortality in the C and HS31°C groups; however, group HS36°C presented a 43.33% mortality ($P < 0.01$ in relation to the C group). Mortality was observed in the first 2 d of the experiment.

Lymphoid Organ Relative Weight

In relation to C group data, a decrease was observed in the relative weights of the spleen (C = 0.096 ± 0.003;

Table 1. Effects of heat stress (HS31°C and HS36°C) for 10 h per day from experimental d 35 to 42 on performance parameters of broiler chickens[1]

	Group		
Performance parameter	Control	HS31°C	HS36°C
BW gain (g)	591.121 ± 66.54	442.46 ± 44.80**	347.72 ± 109.70***
Feed consumption (g/bird)	1,438.00 ± 87.49	1,138.83 ± 84.47***	1,137.3 ± 117.62***
Feed conversion	2.46 ± 0.32	2.51 ± 0.20	3.52 ± 1.03*
Mortality (%)	0	0	43.33**

[1]Results are the mean ± SEM of 5 replicates (n = 5) with 12 chickens per group.

*$P < 0.05$; **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$, compared with the data of the control group (parametric data: 1-way ANOVA followed by Dunnett's test; nonparametric data: Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test).

HS31°C = 0.082 ± 0.007; HS36°C = 0.077 ± 0.006; $P < 0.05$) and thymus (C = 0.58 ± 0.01; HS31°C = 0.52 ± 0.02; HS36°C = 0.42 ± 0.02; $P < 0.01$) only in the HS36°C group in relation to those of the C group (Figure 2). Moreover, a decreased weight was found in the bursa of Fabricius in chickens of the HS31°C and HS36°C groups (C = 0.22 ± 0.009; HS31°C = 0.15 ± 0.01; HS36°C = 0.12 ± 0.01; $P < 0.01$) (Figure 2).

Corticosterone Serum Levels

As observed in Figure 3, birds of the HS31°C and HS36°C groups presented high levels of corticosterone (C = 46.09 ± 3.12; HS31°C = 92.69 ± 8.66; HS36°C = 109.60 ± 12.90; $P < 0.01$) (Figure 3) in relation to those of the C group. Significant differences were not found between data of the HS31°C and HS36°C groups.

Intestinal Histology

Histological intestinal changes were not observed in all cases of C chickens. There were no changes in the duodenum, ileum, or large intestine of both experimental groups (data not shown). There were no alterations in the morphology of the jejunum mucosa, such as in the crypt:villus ratio, villus height, crypt depth, and number of intraepithelial lymphocytes. There was a mild increase of the cellularity of the lamina propria, characterized by mild acute multifocal lymphoplasmocytic enteritis in the jejunum of experimental groups: HS31°C showed this in 7 out of 10 samples (7/10, $P < 0.05$), and HS36°C showed this in 6 out of 10 samples (6/10, $P < 0.05$). Several mild to moderate infiltrates of heterophils' foci were seen in HS31°C (in 5 out of 10 samples, 5/10, $P > 0.05$) and in HS36°C (in 4 out of 10 samples, 4/10, $P > 0.05$). Figure 4 illustrates these alterations.

Peritoneal Macrophage Activity

Representative side scatter versus forward scatter cytograms of chicken peritoneal lavage fluids revealed a distinct cell population (R1) relative to macrophages (Figure 1A). Figure 1B shows a dot plot of specific monoclonal antibodies KUL01-PE (FL2-H)-labeled macrophages. An over 90% positive fluorescence was obtained within the selected gate for SAPI-induced oxidative burst and phagocytosis. The macrophage population was identified by specific monoclonal antibodies KUL01 for chicken monocytes.

An increment in green fluorescence was observed after DCFH-DA load, allowing satisfactory measurements of

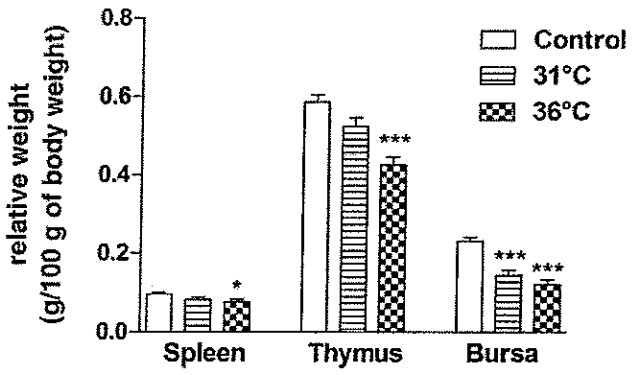


Figure 2. Effects of heat stress (31 ± 1 and 36 ± 1°C) for 10 h per day from experimental d 35 to 42 on the relative weights of lymphoid organs. Data are presented as the means ± SEM (n = 10/group). *$P < 0.05$ and ***$P < 0.001$ compared with the control group (1-way ANOVA followed by Dunnett's test).

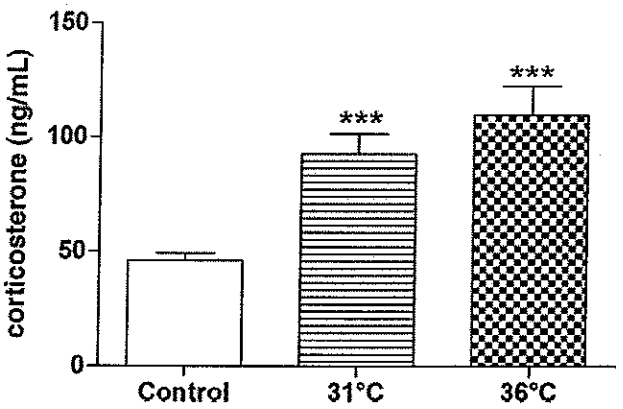


Figure 3. Effects of heat stress (31 ± 1 or 36 ± 1°C) for 10 h per day from experimental d 35 to 42 on the corticosterone serum levels (ng/mL). Data are presented as the means ± SEM (n = 10/group). ***$P < 0.001$ compared with the control group (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test).

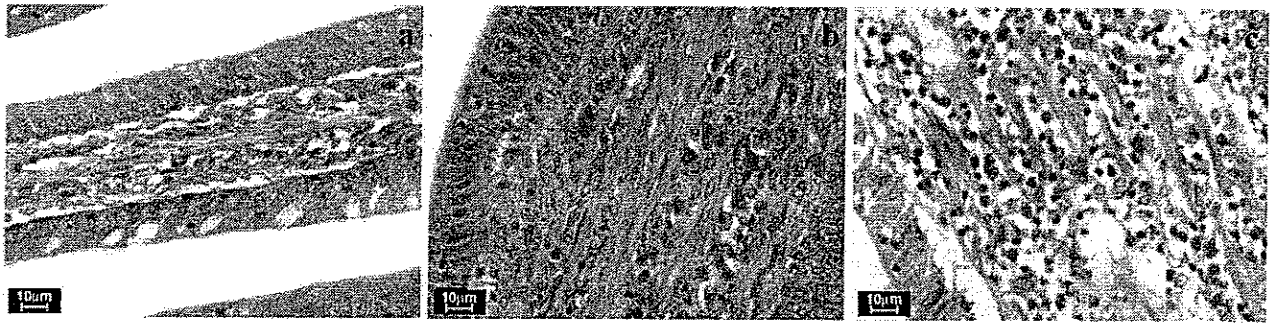


Figure 4. Histology of the small intestine mucosa. a) Jejunum mucosa of the control bird group. Hematoxylin and eosin. Bar = 10 µm. b) Jejunum mucosa of the 31 ± 1°C heat stress broiler chicken group. Mild acute lymphoplasmocytic enteritis. Hematoxylin and eosin. Bar = 10 µm. c) Jejunum mucosa of the 36 ± 1°C heat stress broiler chicken group. Mild acute lymphoplasmocytic enteritis with heterophil focus. Hematoxylin and eosin. Bar = 10 µm.

heat stress effects on the oxidative responses in peritoneal macrophages. Furthermore, red fluorescence was observed after SAPI load. Data analysis showed that chickens of the HS31°C group presented a decrease in macrophage basal oxidative burst ($P < 0.05$) (Figure 5A). Both HS31°C and HS36°C had decreased *S. aureus*-induced oxidative bursts (C = 484.88 ± 37.58; HS31°C = 253.63 ± 31.44; HS36°C = 284.77 ± 43.10; $P < 0.05$ and $P < 0.01$) (Figure 5B). Nevertheless, no alterations were observed in the intensity and percentage of macrophage phagocytosis in both HS31°C and HS36°C groups ($P > 0.05$) (Figure 5C and 5D).

DISCUSSION

Heat stressors (31 and 36°C) applied for 10 h per day from the 35th to the 42nd days of life decreased performance parameters and peritoneal macrophage activity, increasing corticosterone serum levels and inducing minor changes in intestinal mucosa, indicating an inflammatory process in broiler chickens. These changes observed in heat-stressed birds provide evidence for NIM interaction in broiler chickens.

The HPA axis is one of the most important systems for the integration of the body and is activated in re-

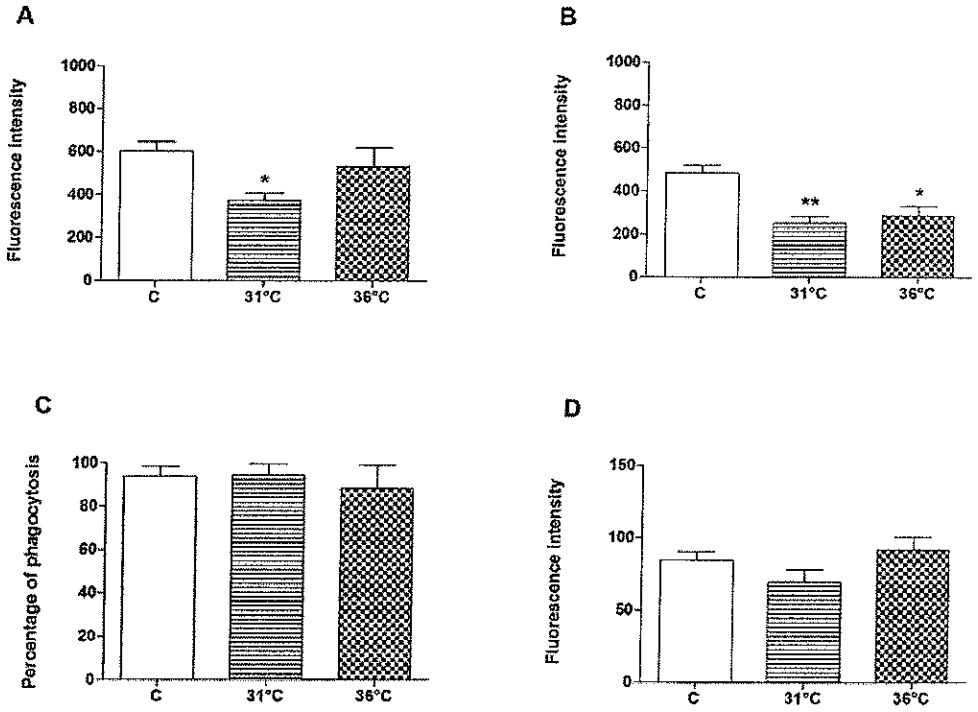


Figure 5. Effects of heat stress (31 ± 1 and 36 ± 1°C) for 10 h per day from experimental d 35 to 42 on the A) basal oxidative burst and B) *Staphylococcus aureus*-induced oxidative burst. Data are presented as the means ± SEM (n = 10/group). C) Percentage of phagocytosis and D) intensity of phagocytosis. *$P < 0.05$ and **$P < 0.01$ compared with the control group data (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test). C = control.

sponse to stressful stimuli or homeostatic disturbances (McEwen, 2000), resulting, among others, in increased levels of plasma corticosterone and in consequent deteriorations in an animal's health status (Righi et al., 1999; Elenkov et al., 2000; Alves et al., 2007; Ligeiro de Oliveira et al., 2008; Quinteiro-Filho et al., 2009). The corticosterone serum levels were higher in the HS31°C and HS36°C stressed broilers of the present experiment. Thus, the observed deficits in stressed broiler chickens' performance indexes, peritoneal macrophage activity, and intestinal integrity might have been a consequence of modifications in HPA function, as suggested elsewhere for man and other animal species in similar contexts (Laudenslager et al., 1985; Ackerman et al., 1988; Lubach et al., 1995; Zorrilla et al., 2001; Gupta et al., 2007; Kranendonk et al., 2008). As a matter of fact, results from Shini et al. (2008b) indicated that exposure to corticosterone increased heterophil:lymphocyte ratio and also induced ultrastructural morphological changes in heterophil size, shape, and granulation and lymphocyte cytoplasmatic characteristics.

We showed here that heat stress (31 and 36°C) decreased BW gain as well as food intake and the feed conversion ratio in broiler chickens. These observed data agree with those reported elsewhere in similar contexts (McKee et al., 1997; Kirunda et al., 2001; Mashaly et al., 2004; Rozenboim et al., 2007; Star et al., 2008). Corticosterone was reported to modulate some performance indexes and immunological parameters of chickens. Specifically, it was shown that broiler chickens injected with corticosterone presented a reduction in BW gain (Shini et al., 2008a). Moreover, corticosterone administration through the drinking water or diet was also shown to significantly reduce chicken growth performance (Post et al., 2003; Lin et al., 2004, 2006). Therefore, it seems feasible to suggest that the heat stressors used in the present study might have changed the broilers' performance, activating the birds' HPA axis activity and thus increasing the corticosterone serum levels. Indeed, in the model used here, heat stressors (31 and 36°C) produced a significant increases (110 to 147% high, respectively) as compared with the control serum corticosterone levels.

Within this context, corticosterone could be acting in the hypothalamic feeding control nuclei that regulate food intake and satisfaction, allowing a decrease in food consumption and consequently a decrease in an animal's BW gain. In addition, it is commonly known that intestinal absorption decreases in the presence of intestinal mucosa injuries (Mitchell and Carlisle, 1992; Söderholm and Perdue, 2001). Stressors are also known to induce gastrointestinal injuries (Glavin, 1980; Burkholder et al., 2008). Because we showed an increase of inflammatory cellular infiltration in the jejunum mucosa, it is not at all impossible that this mucosa inflammation might have also contributed to the decreased BW gain now observed in the heat-stressed broiler chickens. Finally, it should not be forgotten that Lin et al. (2004, 2006) reported an indirect relationship between BW gain and energy expenditure. According to Siegel and Van Kampen (1984), both food intake and energy waste during heat-induced stress are essential for an animal's adaptation (Siegel and Van Kampen, 1984). Thus, an increase in energy waste after the present heat stressor applications cannot be discharged.

A glucocorticoid-dependent mechanism during stress was reported to induce lymphoid organ involution (Puvadolpirod and Thaxton, 2000; Post et al., 2003; Shini et al., 2008a). Accordingly, HPA axis activation might have been responsible for the decrease in the lymphoid organs' relative weights presently observed after heat stress in broiler chickens. Indeed, as reported elsewhere for chickens submitted to similar or different stressors (Heckert et al., 2002; Niu et al., 2009), heat stress in the present experiment decreased the relative weights of the bursa of Fabricius, spleen, and thymus. However, only chickens submitted to the 36°C stressor presented a decrease in spleen and thymus relative weights, suggesting that high levels of stress, HPA axis activation and corticosterone serum levels, or both would be necessary to induce the changes presently being reported.

In the present experiment, heat stressors (31 and 36°C) decreased SAPI-induced peritoneal macrophage oxidative burst but were unable to change both the intensity and the percentage of phagocytosis. In this respect, it could be argued that cells within the cytometric gate analyzed might include other cell types than macrophages. Indeed, it is known that chicken lymphocytes and macrophages present similar complexity, with differences found only in their nucleus (Dietert et al., 1991). However, only macrophages are able to perform SAPI phagocytosis and to change their oxidative burst, a fact that strongly points toward an effect of heat stressors (31 and 36°C) on macrophage activity. Phagocytosis is a complex phenomenon that starts by the binding of the particle to be phagocytosed to specific receptors on the surface of immune cells; it is an active process driven by, among others, tumor or bacterial products, a process in which cytokines play important roles (Keller et al., 1990; Fiddler, 1995). Glucocorticoids are known for their relevant and central roles in immune cell activity (Dunn, 1989; Dunn and Berridge, 1990; Weinstock et al., 1998; Massoco and Palermo-Neto, 1999; Licinio and Frost, 2000; Palermo Neto et al., 2001). Baccan et al. (2004) showed that glucocorticoids increase the transcription of antiinflammatory cytokines [interleukin (IL)-4 and IL-10] and decrease that of proinflammatory cytokines (IL-1, IL-12, IL-6, tumor necrosis factor-α, interferon, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor) (i.e., they modulate the T-helper type 1 versus T-helper type 2 cytokine profile). These hormones also decrease the transcription factors for adhesion molecules such as intercellular adhesion molecule-I and vascular cell adhesion molecule-I (Baccan et al., 2004). Finally, they decrease prostaglandin synthesis and the expression of genes for nitric oxide synthases

(Baccan et al., 2004). Thus, the present observed data on heat stress effects on macrophage oxidative bursts are in agreement because they may have resulted from one or more of those glucocorticoid effects. Indeed, as discussed, heat-stressed broiler chickens presented increased levels of serum corticosterone. However, the effects produced by the different stressors applied on the basal macrophage oxidative bursts were different, unexpectedly appearing only in broilers submitted to the 31°C stressor. Restraint stress decreases NK cell activity in chickens, most probably due to a transient increase in corticosterone serum levels (Kushima et al., 2003). Heat stress (39°C for 7 h/d) presents decreased CD4+ and CD8+ cells and SRBC antibody titers in chickens (Khajavi et al., 2003). Injection of corticosterone decreases antibody production against SRBC and impaired bronchitis vaccine response in chickens (Post et al., 2003; Shini et al., 2008a).

Gastric and intestinal lesions are one of the first manifestations of stress (Cosen-Binker et al., 2004). A normal morphology and integrity of the small intestine is important to prevent bacteria translocation from the intestinal tract to the body as well as for digestion and absorption of nutrients. It was shown that chickens submitted to acute heat stress (30°C/24 h) presented a reduction of the ileum's crypt depths but no significant differences in the villus height and villus:crypt ratio (Burkholder et al., 2008). Moreover, chickens submitted to chronic heat stress presented decreased villus heights (19%) and wet (26%) and dry (31%) intestine weights of the jejunum (Mitchell and Carlisle, 1992). Differently, we showed that heat stress (31 and 36°C) induced no changes in the villus and crypt structures, a fact that might be attributable to the fast intestinal mucosa reepithelization. Indeed, it was shown that the epithelial structure is replaced in less than 36 h after a stressful situation (Burkholder et al., 2008). Therefore, it is possible that such an effect might have also happened in the present experiment. However, it is relevant to point out that an increase in the number of heterophils was found in the stressed chickens' jejunum, a fact that is likely to be indicative of a possible intestinal mucosa barrier dysfunction and, consequently, bacterial infection. Inflammatory infiltrate contributes to the production of proinflammatory cytokines that act in the intestinal epithelium's tight junctions, in turn increasing the mucosa permeability to pathogenic bacteria (Al-Sadi and Ma, 2007; Al-Sadi et al., 2008). Besides that, heat stressors might have also modified the commensal microbiota presence or activity, or both, leading to a loss of protection against pathogenic microorganism colonization (for example, by *Salmonella* sp.; Burkholder et al., 2008). Moreover, dysfunction of commensal microbiota is likely to be related to a decrease of intestinal innate immunity cells' activity, as is presently being reported for peritoneal macrophage activity. According to Brisbin et al., the commensal chicken microbiota strongly contributes to the innate and adaptive immune responses (Brisbin et al., 2008).

Based on these findings, we can reasonably conclude that heat stress activated the chicken HPA axis, increasing corticosterone serum levels and consequently and possibly decreasing food intake, BW gain, relative immune organ weight, and innate immunity. This neuroimmune dysfunction might have influenced the quality of the intestinal-immune barrier, thereby allowing pathogenic bacteria to migrate through the intestinal mucosa and generating an inflammatory infiltrate. This inflammation, in another way, might have changed the intestinal nutrition absorption and consequently contributed to the observed decrease in weight gain. Thus, the present data corroborate with others in the field of NIM and its relation with gastroenterology and provide increased evidence of the importance of preventing heat stress for broiler health and production.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financially supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, no. 06/56677-2 and 09/51886-3) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, no. 470776/2009-9), to whom the authors want to express their gratitude.

REFERENCES

Ackerman, S. H., S. E. Keller, S. J. Schleifer, R. D. Shindledecker, M. Camerino, M. A. Hofer, H. Weiner, and M. Stein. 1988. Premature maternal separation and lymphocyte function. Brain Behav. Immun. 2:161–165.

Ader, R., and N. Cohen. 1975. Behaviorally conditioned immunosuppression. Psychosom. Med. 37:333–340.

Al-Sadi, R., D. Ye, K. Dokladny, and T. Y. Ma. 2008. Mechanism of IL-1β-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. J. Immunol. 180:5653–5661.

Al-Sadi, R. M., and T. Y. Ma. 2007. IL-1β causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. J. Immunol. 178:4641–4649.

Alves, G. J., L. Vismari, J. C. Florio, and J. Palermo-Neto. 2006. Cohabitation with a sick cage mate: Effects on noradrenaline turnover and neutrophil activity. Neurosci. Res. 56:172–179.

Alves, G. J., L. Vismari, and J. Palermo-Neto. 2007. Cohabitation with a sick cage mate: Effects on ascitic form of Ehrlich tumor growth and macrophage activity. Neuroimmunomodulation 14:297–303.

Baccan, G. C., R. D. Oliveira, and B. Mantovani. 2004. Stress and immunological phagocytosis: Possible nongenomic action of corticosterone. Life Sci. 75:1357–1368.

Bartlett, J. R., and M. O. Smith. 2003. Effects of different levels of zinc on the performance and immunocompetence of broilers under heat stress. Poult. Sci. 82:1580–1588.

Basso, A. S., F. A. Costa-Pinto, L. R. Britto, L. C. de Sá-Rocha, and J. Palermo-Neto. 2004. Neural pathways involved in food allergy signaling in the mouse brain: Role of capsaicin-sensitive afferents. Brain Res. 1009:181–188.

Besedovsky, H., A. del Rey, E. Sorkin, M. Da Prada, R. Burri, and C. Honegger. 1983. The immune response evokes changes in brain noradrenergic neurons. Science 221:564–566.

Besedovsky, H., and E. Sorkin. 1977. Network of immune-neuroendocrine interactions. Clin. Exp. Immunol. 27:1–12.

Besedovsky, H., E. Sorkin, M. Keller, and J. Muller. 1975. Changes in blood hormone levels during the immune response. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 150:466–470.

Blalock, J. E. 1984. The immune system as a sensory organ. J. Immunol. 132:1067–1070.

Bonafos, L., D. Simonin, and A. Gavinelli. 2010. Animal welfare: European legislation and future perspectives. J. Vet. Med. Educ. 37:26–29.

Borges, S. A., A. V. Fischer da Silva, A. Majorka, D. M. Hooge, and K. R. Cummings. 2004. Physiological responses of broiler chickens to heat stress and dietary electrolyte balance (sodium plus potassium minus chloride, milliequivalents per kilogram). Poult. Sci. 83:1551–1558.

Brisbin, J. T., J. Gong, and S. Sharif. 2008. Interactions between commensal bacteria and the gut-associated immune system of the chicken. Anim. Health Res. Rev. 9:101–110.

Burkholder, K. M., K. L. Thompson, M. E. Einstein, T. J. Applegate, and J. A. Patterson. 2008. Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to *Salmonella enteritidis* colonization in broilers. Poult. Sci. 87:1734–1741.

Cosen-Binker, L. I., M. G. Binker, G. Negri, and O. Tiscornia. 2004. Influence of stress in acute pancreatitis and correlation with stress-induced gastric ulcer. Pancreatology 4:470–484.

Costa-Pinto, F. A., and J. Palermo-Neto. 2010. Neuroimmune interactions in stress. Neuroimmunomodulation 17:196–199.

Dietert, R. R., K. A. Golemboski, S. E. Bloom, and M. A. Qureshi. 1991. The avian macrophage in cellular immunity. Pages 51–70 in Avian Cellular Immunology. J. M. Sharma, ed. CRC Press, Boca Raton, FL.

Dunn, A. J. 1989. Psychoneuroimmunology for the psychoneuroendocrinologist: A review of animal studies of nervous system-immune system interactions. Psychoneuroendocrinology 14:251–274.

Dunn, A. J., and C. W. Berridge. 1990. Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: Is CRF a mediator of anxiety or stress responses? Brain Res. Brain Res. Rev. 15:71–100.

Elenkov, I. J., R. L. Wilder, G. P. Chrousos, and E. S. Vizi. 2000. The sympathetic nerve—An integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. Pharmacol. Rev. 52:595–638.

Fiddler, I. J. 1995. Melanoma metastasis. Cancer Control 2:398–404.

Glavin, G. B. 1980. Restraint ulcer: History, current research and future implications. Brain Res. Bull. 5(Suppl. 1):51–58.

Gupta, S., B. Earley, and M. A. Crowe. 2007. Pituitary, adrenal, immune and performance responses of mature Holstein × Friesian bulls housed on slatted floors at various space allowances. Vet. J. 173:594–604.

Hasui, M., Y. Hirabayashi, and Y. Kobayashi. 1989. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. J. Immunol. Methods 117:53–58.

Heckert, R. A., I. Estevez, E. Russek-Cohen, and R. Pettit-Riley. 2002. Effects of density and perch availability on the immune status of broilers. Poult. Sci. 81:451–457.

Hodges, R. D. 1974. The Histology of the Fowl. Academic Press, London, UK.

Irwin, M., R. L. Hauger, L. Jones, M. Provencio, and K. T. Britton. 1990. Sympathetic nervous system mediates central corticotropin-releasing factor induced suppression of natural killer cytotoxicity. J. Pharmacol. Exp. Ther. 255:101–107.

Keller, R., R. Keist, and K. Frei. 1990. Lymphokines and bacteria, that induce tumoricidal activity, trigger a different secretory response in macrophages. Eur. J. Immunol. 20:695–698.

Khajavi, M., S. Rahimi, Z. M. Hassan, M. A. Kamali, and T. Mousavi. 2003. Effect of feed restriction early in life on humoral and cellular immunity of two commercial broiler strains under heat stress conditions. Br. Poult. Sci. 44:490–497.

Kirunda, D. F., S. E. Scheideler, and S. R. McKee. 2001. The efficacy of vitamin E (DL-α-tocopheryl acetate) supplementation in hen diets to alleviate egg quality deterioration associated with high temperature exposure. Poult. Sci. 80:1378–1383.

Kranendonk, G., E. J. Mulder, N. Parvizi, and M. A. Taverne. 2008. Prenatal stress in pigs: Experimental approaches and field observations. Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes 116:413–422.

Kushima, K., M. Fujita, A. Shigeta, H. Horiuchi, H. Matsuda, and S. Furusawa. 2003. Flow cytometric analysis of chicken NK activity and its use on the effect of restraint stress. J. Vet. Med. Sci. 65:995–1000.

Laudenslager, M., J. P. Capitanio, and M. Reite. 1985. Possible effects of early separation experiences on subsequent immune function in adult macaque monkeys. Am. J. Psychiatry 142:862–864.

Licinio, J., and P. Frost. 2000. The neuroimmune-endocrine axis: Pathophysiological implications for the central nervous system cytokines and hypothalamus-pituitary-adrenal hormone dynamics. Braz. J. Med. Biol. Res. 33:1141–1148.

Ligeiro de Oliveira, A. P., R. Lazzarini, G. Cavriani, W. M. Quinteiro-Filho, W. Tavares de Lima, and J. Palermo-Neto. 2008. Effects of single or repeated amphetamine treatment and withdrawal on lung allergic inflammation in rats. Int. Immunopharmacol. 8:1164–1171.

Lin, H., E. Decuypere, and J. Buyse. 2004. Oxidative stress induced by corticosterone administration in broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*). 1. Chronic exposure. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 139:737–744.

Lin, H., S. J. Sui, H. C. Jiao, J. Buyse, and E. Decuypere. 2006. Impaired development of broiler chickens by stress mimicked by corticosterone exposure. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol. 143:400–405.

Lubach, G. R., C. L. Coe, and W. B. Ershler. 1995. Effects of early rearing environment on immune responses of infant rhesus monkeys. Brain Behav. Immun. 9:31–46.

Madden, K. S., and D. L. Felten. 1995. Experimental basis for neural-immune interactions. Physiol. Rev. 75:77–106.

Main, D. C., M. C. Appleby, D. B. Wilkins, and E. S. Paul. 2009. Essential veterinary education in the welfare of food production animals. Rev. Sci. Tech. 28:611–616.

Marsh, J. A., and C. G. Scanes. 1994. Neuroendocrine-immune interactions. Poult. Sci. 73:1049–1061.

Mashaly, M. M., G. L. Hendricks 3rd, M. A. Kalama, A. E. Gehad, A. O. Abbas, and P. H. Patterson. 2004. Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. Poult. Sci. 83:889–894.

Mashaly, M. M., J. M. Trout, G. Hendricks 3rd, L. M. al-Dokhi, and A. Gehad. 1998. The role of neuroendocrine immune interactions in the initiation of humoral immunity in chickens. Domest. Anim. Endocrinol. 15:409–422.

Massoco, C. O., and J. Palermo-Neto. 1999. Diazepam effects of peritoneal macrophage activity and corticosterone serum levels in Balb/C mice. Life Sci. 65:2157–2165.

Mast, J., B. M. Goddeeris, K. Peeters, F. Vandesande, and L. R. Berghman. 1998. Characterisation of chicken monocytes, macrophages and interdigitating cells by the monoclonal antibody KUL01. Vet. Immunol. Immunopathol. 61:343–357.

McEwen, B. S. 2000. The neurobiology of stress: From serendipity to clinical relevance. Brain Res. 886:172–189.

McKee, J. S., P. C. Harrison, and G. L. Riskowski. 1997. Effects of supplemental ascorbic acid on the energy conversion of broiler chicks during heat stress and feed withdrawal. Poult. Sci. 76:1278–1286.

Miller, A. H. 1998. Neuroendocrine and immune system interactions in stress and depression. Psychiatr. Clin. North Am. 21:443–463.

Mitchell, M. A., and A. J. Carlisle. 1992. The effects of chronic exposure to elevated environmental temperature on intestinal morphology and nutrient absorption in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). Comp. Biochem. Physiol. A Comp. Physiol. 101:137–142.

Morgulis, M. S., P. M. Rodrigues, and J. Palermo-Neto. 1999. Benzodiazepine receptors and avian macrophage activity: Diazepam decreases spreading and phagocytosis. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 21:787–802.

Niu, Z. Y., F. Z. Liu, Q. L. Yan, and W. C. Li. 2009. Effects of different levels of vitamin E on growth performance and immune responses of broilers under heat stress. Poult. Sci. 88:2101–2107.

Palermo-Neto, J., C. de Oliveira Massoco, and W. Robespierre de Souza. 2003. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. Brain Behav. Immun. 17:43–54.

Palermo-Neto, J., E. S. Fonseca, W. M. Quinteiro-Filho, C. S. Correia, and M. Sakai. 2008. Effects of individual housing on behavior and resistance to Ehrlich tumor growth in mice. Physiol. Behav. 95:435–440.

Palermo Neto, J., C. O. Massoco, and R. C. Favare. 2001. Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. Neurotoxicol. Teratol. 23:497–507.

Post, J., J. M. Rebel, and A. A. ter Huurne. 2003. Physiological effects of elevated plasma corticosterone concentrations in broiler chickens. An alternative means by which to assess the physiological effects of stress. Poult. Sci. 82:1313–1318.

Puvadolpirod, S., and J. P. Thaxton. 2000. Model of physiological stress in chickens. 1. Response parameters. Poult. Sci. 79:363–369.

Quinteiro-Filho, W. M., D. A. Righi, and J. Palermo-Neto. 2009. Effect of cyhalothrin on Ehrlich tumor growth and macrophage activity in mice. Braz. J. Med. Biol. Res. 42:912–917.

Qureshi, M. A., R. R. Dietert, and L. D. Bacon. 1986. Genetic variation in the recruitment and activation of chicken peritoneal macrophages. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 181:560–568.

Riddell, C. 1987. Avian Histopathology. American Association of Avian Pathologists, Allen Press Inc., Lawrence, KS.

Righi, D. A., S. R. Pinheiro, J. L. Guerra, and J. Palermo-Neto. 1999. Effects of diazepam on *Mycobacterium bovis*-induced infection in hamsters. Braz. J. Med. Biol. Res. 32:1145–1153.

Rozenboim, I., E. Tako, O. Gal-Garber, J. A. Proudman, and Z. Uni. 2007. The effect of heat stress on ovarian function of laying hens. Poult. Sci. 86:1760–1765.

Sá-Rocha, V. M., L. C. Sá-Rocha, and J. Palermo-Neto. 2006. Variations in behavior, innate immunity and host resistance to B16F10 melanoma growth in mice that present social stable hierarchical ranks. Physiol. Behav. 88:108–115.

Selye, H. 1998. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci. 10:230–231.

Shini, S., P. Kaiser, A. Shini, and W. L. Bryden. 2008a. Biological response of chickens (*Gallus gallus domesticus*) induced by corticosterone and a bacterial endotoxin. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 149:324–333.

Shini, S., P. Kaiser, A. Shini, and W. L. Bryden. 2008b. Differential alterations in ultrastructural morphology of chicken heterophils and lymphocytes induced by corticosterone and lipopolysaccharide. Vet. Immunol. Immunopathol. 122:83–93.

Siegel, H. S., and M. Van Kampen. 1984. Energy relationships in growing chickens given daily injections of corticosterone. Br. Poult. Sci. 25:477–485.

Söderholm, J. D., and M. H. Perdue. 2001. Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 280:G7–G13.

Star, L., B. Kemp, I. van den Anker, and H. K. Parmentier. 2008. Effect of single or combined climatic and hygienic stress in four layer lines: 1. Performance. Poult. Sci. 87:1022–1030.

Trout, J. M., and M. M. Mashaly. 1994. The effects of adrenocorticotropic hormone and heat stress on the distribution of lymphocyte populations in immature male chickens. Poult. Sci. 73:1694–1698.

Washburn, B. E., D. L. Morris, J. J. Millspaugh, J. Faaborg, and J. H. Schulz. 2002. Using a commercially available radioimmunoassay to quantify corticosterone in avian plasma. Condor 104:558–563.

Weinstock, M., T. Poltyrev, D. Schorer-Apelbaum, D. Men, and R. McCarty. 1998. Effect of prenatal stress on plasma corticosterone and catecholamines in response to footshock in rats. Physiol. Behav. 64:439–444.

Zorrilla, E. P., L. Luborsky, J. R. McKay, R. Rosenthal, A. Houldin, A. Tax, R. McCorkle, D. A. Seligman, and K. Schmidt. 2001. The relationship of depression and stressors to immunological assays: a meta-analytic review. Brain Behav. Immun. 15:199–226.

ANEXO B

JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE
The Premier Journal and Leading Source of New Knowledge and Perspective in Animal Science

Acute heat stress impairs performance parameters and induces mild intestinal enteritis in broiler chickens: Role of acute hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation

W. M. Quinteiro-Filho, M. V. Rodrigues, A. Ribeiro, V. Ferraz-de-Paula, M. L. Pinheiro, L. R. M. Sá, A. J. P. Ferreira and J. Palermo-Neto

J ANIM SCI 2012, 90:1986-1994.
doi: 10.2527/jas.2011-3949 originally published online January 6, 2012

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:
http://www.journalofanimalscience.org/content/90/6/1986

American Society of Animal Science

www.asas.org

Downloaded from www.journalofanimalscience.org at Sistema Integrado de Bibliotecas daUSP on September 12, 2012

Acute heat stress impairs performance parameters and induces mild intestinal enteritis in broiler chickens: Role of acute hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation[1]

W. M. Quinteiro-Filho,* M. V. Rodrigues*, A. Ribeiro*, V. Ferraz-de-Paula,* M. L. Pinheiro,* L. R. M. Sá, † A. J. P. Ferreira,‡ and J. Palermo-Neto*[2]

*Neuroimmunomodulation Research Group, Department of Pathology, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; †Laboratory of Gastroenterology, Department of Pathology, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, and ‡Laboratory of Ornitophatology, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

ABSTRACT: Studies on the environmental consequences of stress are relevant for economic and animal welfare reasons. We recently reported that long-term heat stressors (31 ± 1°C and 36 ± 1°C for 10 h/d) applied to broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*) from d 35 to 42 of life increased serum corticosterone concentrations, decreased performance variables and the macrophage oxidative burst, and produced mild, multifocal acute enteritis. Being cognizant of the relevance of acute heat stress on tropical and subtropical poultry production, we designed the current experiment to analyze, from a neuroimmune perspective, the effects of an acute heat stress (31 ± 1°C for 10 h on d 35 of life) on serum corticosterone, performance variables, intestinal histology, and peritoneal macrophage activity in chickens. We demonstrated that the acute heat stress increased serum corticosterone concentrations and mortality and decreased food intake, BW gain, and feed conversion ($P < 0.05$). We did not find changes in the relative weights of the spleen, thymus, and bursa of Fabricius ($P > 0.05$). Increases in the basal and the *Staphylococcus aureus*-induced macrophage oxidative bursts and a decrease in the percentage of macrophages performing phagocytosis were also observed. Finally, mild, multifocal acute enteritis, characterized by the increased presence of lymphocytes and plasmocytes within the lamina propria of the jejunum, was also observed. We found that the stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation was responsible for the negative effects observed on chicken performance and immune function as well as for the changes in the intestinal mucosa. The data presented here corroborate with those presented in other studies in the field of neuroimmunomodulation and open new avenues for the improvement of broiler chicken welfare and production performance.

Key words: corticosterone, heat stress, hypothalamic-pituitary-adrenal axis, macrophage, neuroimmunomodulation, welfare.

© *2012 American Society of Animal Science. All rights reserved.*

J. Anim. Sci. 2012.90:1986–1994
doi:10.2527/jas2011-3949

INTRODUCTION

The existence of a bidirectional relationship between the central nervous system (**CNS**) and the immune system were demonstrated by many authors (Besedovsky et al., 1977; Selye, 1998). Ever since pioneer stress work of Selye in 1936 (Selye, 1998), this area of knowledge has grown more organized, being crucial to the establishment of the field of neuroimmunomodulation (**NIM**) or psychoneuroimmunology (Dantzer, 2001; Elenkov and Chrousos, 2002; Blalock and Smith, 2007; Palermo-Neto et al., 2008; Costa-Pinto and Palermo-Neto, 2010).

Stress from the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (**HPA**) axis and the sympathetic nervous

[1]This research was supported by the FAPESP Foundation (no. 09/51886-3), CNPq (no. 470776/2009-9), and PIBIC-CAPES (no. 1345/2008), to which the authors express their sincere gratitude.
[2]Corresponding Author: jpalermo@usp.br
Received February 4, 2011.
Accepted December 2, 2011.

Downloaded from www.journalofanimalscience.org at Sistema Integrado de Bibliotecas daUSP on September 12, 2012

system (SNS) and other neuroendocrine pathways, is responsible for many brain activities and behavioral and immune alterations (Besedovsky and del Rey, 1996; McEwen et al., 1997; Zorrilla et al., 2001). However, although stress-mediated neuroimmune interactions in health and disease are unequivocal, only a few studies have analyzed stressor effects in production animals, for example, poultry.

In our laboratory, we showed that heat stress (31 ± 1°C and 36 ± 1°C) applied to broiler chickens from d 35 to 42 of life increased serum corticosterone concentrations, simultaneously decreasing BW gain and feed intake (Quinteiro-Filho et al., 2010). A concomitant decrease in lymphoid organ weights and the macrophage basal and *S. aureus*–induced oxidative burst also were found. Moreover, mild, multifocal acute enteritis, characterized by the increased presence of lymphocytes and plasmocytes within the lamina propria of the jejunum, was also observed (Quinteiro-Filho et al., 2010). These findings were thought to be a consequence of the heat stress-induced HPA axis activation.

Considering these factors, we sought to analyze, from a neuroimmune perspective, the effects of an acute, experimentally-induced heat stress (31 ± 1°C/10 h) on broiler chicken performance, HPA-axis activity, innate immune function, and intestinal mucosa integrity.

MATERIALS AND METHODS

The animals in these experiments were maintained and used in accordance with the guidelines of the Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources of the School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Brazil.

Animals and Group Formation

One-day-old broiler chickens were housed in 2 adjacent climate-controlled rooms until the end of experimental period at the Experimental Center of Avian Pathology, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo. A total of 240 male broiler chickens, from 1 to 36 d old, were used. Two blocks of experiments were done. One experiment block to analyze the performance variables, and another to analyze all other variables (described below). Animals were obtained from a commercial hatchery and housed in 10 floor pens (5 pens/climate-controlled room) covered with sterilized and contaminant-free wood shavings with 12 birds/pen (respected 10 birds/m²) with water and food (hanging feeders) provided ad libitum. The temperature and humidity were monitored with a digital hygrometer/thermometer (La Crosse Technology, La Crosse, WI). Every day for the experimental period, the broiler chickens were observed for health status (respiratory signs, feathers and skin heath, quality of feces, color of mucosa, and prostration) and behavior (locomotion, feed behavior, and social behavior).

From d 1 to 35 of life (experimental day = $\mathbf{ED_1}$ to $\mathbf{ED_{35}}$), the birds were maintained at the recommended environmental temperature (33 ± 1°C from ED_1 to ED_7, 28 ± 1°C from ED_7 to ED_{21} and 24 ± 1°C from ED_{21} to ED_{35}). On ED_{34}, all the broiler chickens were weighed and maintained in 2 groups: a control group (**CON**) and an acute heat-stressed group (**HS31°C**/10h), each group per climate-controlled room. On ED_{35}, broilers in the acute heat-stressed group were kept under an environmental temperature of 31 ± 1°C from 0800 to 1800 h (10 h acute heat stress); to increase the temperature, the heater-air conditioning was turned on 30 min before the beginning of heat period. The broilers in the CON group were kept during ED_{35} at an environmental temperature of 21 ± 1°C for the entire day. From 1830 h on ED_{35} to 0800 h on ED_{36}, the environmental temperature of the acute heat-stressed group was reduced to that of the CON group (21 ± 1°C). To decrease the temperature the heater-air conditioning was turned off at 1800 h and the temperature also decreased to 21 ± 1°C in 30 min. The animals in both groups were analyzed according to experimental protocols and euthanatized on ED_{36} (between 0800 and 1000 h).

Performance Variables

Broiler chicken performance was assessed through mortality rate, BW gain, feed consumption per animal, feed conversion, and water consumption. The feed conversion ratio was calculated based on the G:F for each replicate-pen. For each treatment group (CON and HS31°C) of animals, 5 replications (pens) with 12 animals/box were analyzed (n = 5). Data were collected during ED_{35} and ED_{36}, before and after the acute heat stress.

Organ Harvest

On ED_{36}, immediately after weighing, 10 birds/group were randomly taken for analysis (2/pen) and euthanatized by cervical dislocation. At necropsy, lymphoid organs (thymus, spleen, and bursa of Fabricius) were harvested for relative weight determinations; connective tissue was excised before measuring weight. The small intestine also was harvested (duodenum, jejunum, and ileum) and fixed in a 10% neutral buffered formalin solution for histological analysis.

Intestinal Morphology

Specimens for light microscopy were taken from several sites of small bowel segments. The intestinal segments were defined based on anatomic limits, as

Downloaded from www.journalofanimalscience.org at Sistema Integrado de Bibliotecas daUSP on September 12, 2012

follows: the length of the duodenum [from the gizzard, or duodenum ostium to the beginning of the mesentery (duodenal loop)]; the length of the jejunum (from the most distal point of insertion of the mesentery to 5 cm proximal to Meckel's diverticulum); and the length of the ileum (from 5 cm distal to Meckel's diverticulum to the ileocecal junction). Tissues were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, cut to 4 to 5 μm thick and stained with hematoxylin and eosin (**HE**) for light microscopy. All slides were examined for pathological changes by 2 different pathologists who were blinded to the group affiliation; a positive correlation (r = 0.96) was found between their evaluations.

The histological variables analyzed were as follows: villous height, crypt morphology, and depth, villous height:crypt depth ratio, intensity and composition of inflammatory infiltrate in the lamina propria, and number of intraepithelial lymphocytes/100 enterocytes. The intensity of small intestinal lesions was semi-quantitatively scored on a 0 to 3 scale, in which 0 represented control material, 1 represented mild alteration, 2 represented moderate alteration, and 3 represented severe alteration. The normal histological criteria used were defined by Hodges (1974) and Riddell (1987).

Serum Corticosterone Determination

Ten broilers per group were randomly selected (2/pen), and 2 mL of blood was collected from their brachial veins in 30 s to 1 min. Corticosterone concentrations were measured on ED_{35}, immediately after the end of the acute heat stress (between 1800 and 1900 h). Whole blood was used to collect serum for corticosterone assays. Corticosterone serum concentrations were determined by RIA using an ImmunoChem Double Antibody Corticosterone ^{125}I RIA Kit (MP Biomedicals, LLC Orangeburg, NY), as previously described by Washburn et al. (2002).To decrease the variability of data within measurement of serum corticosterone, we alternated between control and experimental animals for euthanasia and blood collection.

Peritoneal Macrophage Activity

Because chickens do not have resident peritoneal macrophages, activation was performed as proposed by Qureshi et al. (1986) and modified by Quinteiro-Filho et al. (2010). Briefly, 3% Sephadex G-50 Fine (Sigma, St. Louis, MO) in 0.9% saline solution was injected at a dose of 5 mL/200 g BW into the peritoneal cavity of 10 chickens from each group (CON and HS31°C) on ED_{34}. Forty-eight hours after the inoculation (ED_{36}), the animals were euthanized by cervical dislocation and cellular and cytometric analyses were obtained as described by Quinteiro-Filho et al. (2010).

Macrophage Phenotype

Peritoneal macrophage phenotype was used to accurately characterize the cell population corresponding to macrophages. A monoclonal antibody KUL01-PE (ABcam, Cambridge, MA) was employed according to the manufacturer's instructions. The KUL01 is a specific antibody for monocytes and macrophages of avian species (Mast et al., 1998). Fluid obtained from peritoneal lavage was incubated with KUL01 for 30 min and subsequently analyzed using flow cytometry.

Peritoneal Macrophage Activity Measurement

A flow cytometer (FACS Calibur, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) interfaced with a Macintosh G4 computer was used for data collection. Data from 5,000 events were collected in list mode and analyzed in Cell Quest (Becton Dickinson Immunocytometry Systems). Cell populations were identified based on their properties on forward scatter (**FSC**)/ side scatter (**SSC**) plots, mechanically sorted (FAC-Scan, Becton Dickinson Immunocytometry Systems), and were evaluated through light microscopy after staining with Giemsa. The macrophage population was confirmed by the KUL01 phenotype method previously described. Data from peritoneal macrophages were collected and analyzed by applying gates that sorted out lymphocyte and monocyte clusters. Fluorescence data were collected on a log scale. Green fluorescence from 2′,7′-dichlorofluorescein diacetate (**DCFH**) was measured at 530 ± 30 nm (FL1 detector), and red fluorescence from propidium iodide (**PI**)-labeled *S. aureus* was measured at 585 ± 42 nm (FL2). The PI and DCFH fluorescence were analyzed after fluorescence compensation to correct for any crossover between the PI and DCFH signals.

The quantification of the amount of phagocytosis and oxidative burst was estimated by the mean fluorescence in PI and DCFH cells, respectively. Briefly, peritoneal macrophages (2×10^6 cells/mL) collected as described above were mixed with 200 μL of DCFH-DA (0.3 m*M*) in PBS and 100 μL of PI-labeled *S. aureus* in polypropylene tubes (1,000 bacteria:1 macrophage). Samples were incubated under agitation at 37°C for 30 min. Reactions were stopped by adding 2 mL of cold EDTA solution (3 m*M*) to stop phagocytosis. Samples were then centrifuged (250 × *g* for 10 min at 4°C), and the cell pellets obtained were resuspended in 0.5 mL of ice-cold PBS for flow cytometry. Direct measurements of mean fluorescence on green and red channels were recorded as the amount of oxidative burst and phagocytosis, respectively, as proposed by Hasui et al. (1989). The percentage of cells undergoing phagocytosis (percentage of macrophages that ingested bacteria) was

Downloaded from www.journalofanimalscience.org at Sistema Integrado de Bibliotecas daUSP on September 12, 2012

expressed as the number of macrophages with red fluorescence, divided by the total number of cells (multiplied by 100). The intensity of phagocytosis (quantity of ingested bacteria) was measured directly through the intensity of fluorescence emitted by the cells that performed phagocytosis.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). The Bartlett test was used to determine whether the data had homogeneity of variances and Kolmogorov-Smirnov test was applied to determine normality and, therefore, whether the data should be analyzed by parametric or nonparametric tests. The Student's *t*-test (unpaired, 2-tailed) was then used to compare parametric data and the Mann-Whitney U-test was used to compare nonparametric data. We analyzed 10 animals/experimental group, 2 animals selected randomly of each pen (5 pens with 12 animals/pen; n = 10). Statistical significance was based on $P < 0.05$. Data are reported as mean ± SD.

RESULTS

Performance Variables

All performance variables were altered in chickens submitted to an acute (31°C ± 1) heat stress (Table 1). Acute HS31°C decreased BW gain ($P < 0.01$), feed consumption ($P < 0.01$) and feed conversion ($P < 0.01$). Control and HS31°C groups experienced 0 and 26% mortality, respectively ($P < 0.05$). However, chickens in the HS31°C group did not experience differences in water consumption parameters ($P > 0.05$).

Relative Weight of Lymphoid Organs

Compared with the CON group, there was no difference in the relative weights of the spleen (g; CON = 0.12 ± 0.026; HS31°C = 0.12 ± 0.04; $P > 0.05$), thymus (CON = 0.61 ± 0.15; HS31°C = 0.56 ± 0.10; $P > 0.05$) and bursa of Fabricius (CON = 0.24 ± 0.05; HS31°C = 0.23 ± 0.07; $P > 0.05$).

Corticosterone Serum Concentrations

Compared with animals in the CON group, animals in the HS31°C group experienced increased serum corticosterone (ng/mL) (CON = 31.1 ± 20.9; HS31°C = 98.0 ± 63.4; $P < 0.05$) immediately after the end of the acute heat stress.

Table 1. Effects of an acute heat stress (HS31°C) applied for 10 h on ED_{35} (from 0800 to 1800 h) on performance variables of broiler chickens

	Group[1]	
Performance variable	Control	HS31°C[2]
BW gain, g/animal	69.2 ± 11,2	−38.2 ± 27.1***
Feed consumption, g/animal	186.6 ± 6.4	128.0 ± 17.0*
Feed conversion	2.75 ± 0.50	−4.70 ± 2.72***
Water consumption, L/animal	0.46 ± 0.09	0.41 ± 0.10
Mortality, %	0	26%#

[1]Results are the mean ± SD of five pens (n = 5) with 12 chickens/group.

[2]* $P < 0.05$ and ***$P < 0.001$ compared with control group (parametric data: Student's *t*-test; non-parametric data: Mann Whitney U-test). # p<0.05 compared with control group (non-parametric data: Mann Whitney U-test).

Intestinal Histology

Changes in intestinal histology were not observed in any cases of control chickens. No changes ($P > 0.05$) were detected in the duodenum, ileum, or large intestine of either the CON or experimental groups (data not shown). Furthermore, there were no morphologic differences ($P > 0.05$) in the jejunal mucosa between the groups, such as the crypt/villus ratio, villus height, crypt depth, and number of intraepithelial lymphocytes. However, a subtle increase in the cellularity of the lamina propria was observed in animals in the acute heat stress group, characterized by subtle, acute, multifocal lympho-plasmocytic enteritis in the jejunum of experimental groups (present in 6/10 samples in the HS31°C group; $P < 0.05$). Finally, several subtle to moderate infiltrates with foci of heterophils were seen in the HS31°C group (6/10 samples; $P < 0.05$). Figure 1 illustrates some of these alterations.

Peritoneal Macrophage Activity

Representative SSC vs. FSC cytograms of chicken peritoneal lavage fluids revealed a distinct macrophage cell population (R1; Figure 2). Within the selected gate for SAPI-induced oxidative burst and phagocytosis, more than 90% fluorescence was observed. The macrophage population was identified by specific monoclonal antibodies (**Mab**) KUL-01 for chicken monocytes.

Data analysis showed that chickens in the HS31°C group experienced an increase in macrophage basal oxidative burst (CON = 484.8 ± 37.5; HS31°C = 253.6 ± 31.4 mean of fluorescence intensity; $P < 0.05$) and *S. aureus*-induced oxidative burst (CON = 484.8 ± 37.5; HS31°C = 253.6 ± 31.4; $P < 0.05$; Figures 3A and 3B) compared with those in the CON group. However, a decrease in the percentage of macrophages undergoing phagocytosis was observed in the HS31°C group ($P < 0.05$; Figure 3C).

Downloaded from www.journalofanimalscience.org at Sistema Integrado de Bibliotecas daUSP on September 12, 2012

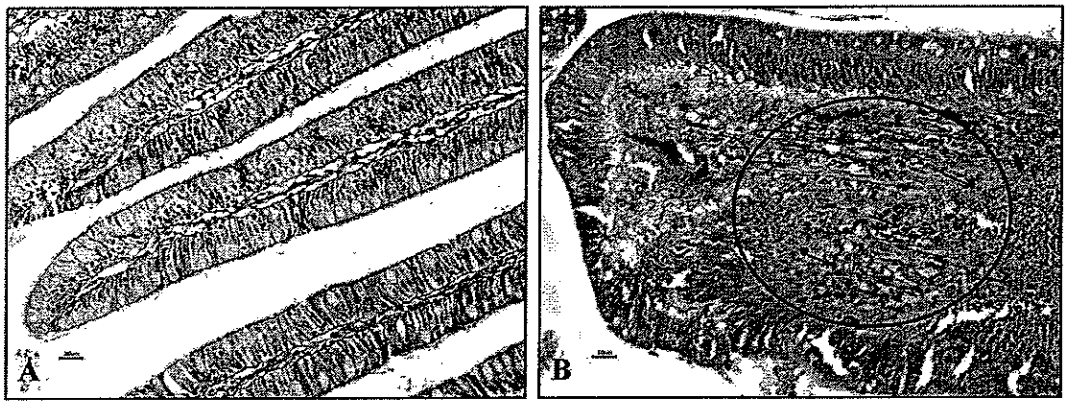


Figure 1. Histology of the small intestine mucosa. (A) Typical jejunal mucosa of animals in the control group. (B) Typical jejunal mucosa in the HS31°C broiler chicken group. The circle represents the mild acute lympho-plasmocytic enteritis with a heterophilic focus (arrows). Hematoxylin and eosin, 200×. Bar = 20 μm.

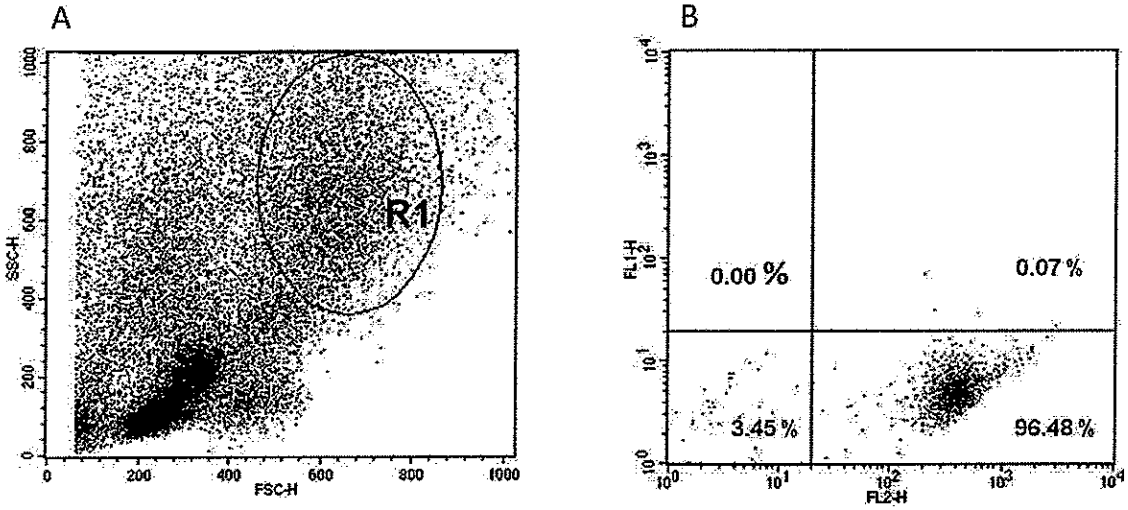


Figure 2. (A) Typical side scatter (SSC) and forward scatter (FSC) cytogram of peritoneal lavage fluid from broiler chicken and gate of macrophage population at gate of macrophage population (R1). (B) Dot plot of specific monoclonal antibodies (Mab) KUL-01-PE (FL2H) labeled macrophages.

Nevertheless, compared with the CON group, there was no difference ($P > 0.05$) in the intensity of macrophage phagocytosis in the HS31°C group (Figure 3D).

DISCUSSION

Acute 31°C heat stress applied for 10 h on the 35th day of life decreased performance variables, increased corticosterone serum concentrations, and induced minor changes in the intestinal mucosa of the broiler chickens. Furthermore, macrophages taken from stressed chickens demonstrated an increase in the basal and *S. aureus*-induced oxidative burst and a decreased percentage of cells undergoing phagocytosis.

Classical studies on stress conducted by Hans Selye in 1936 described stress as a syndrome characterized by signs and symptoms that include, among other features, adrenal gland hypertrophy, gastric ulcers and lymphoid organ atrophy (thymus, spleen, and lymph nodes; Selye, 1998). Some of these effects could not be reproduced in the present study of broiler chickens. Contrary to our previously reported data (Quinteiro-Filho et al., 2010), we did not find differences in the relative weights of the spleen, thymus, and bursa of Fabricius. It is known that stress-induced immune alterations depend on the type of stressor, its duration and frequency, and the temporal relationship between the stress application and the immune system evaluation (Avitsur et al., 2003; Bartolomucci et al., 2005; Queiroz Jde et al., 2008). Because immune tissues were weighed at the same time after the end of the acute and the long-term heat stress application, it seems feasible to think the observed differences rely on the frequency of the application of the heat stress. If this is so, then a long-term heat stress

Downloaded from www.journalofanimalscience.org at Sistema Integrado de Bibliotecas daUSP on September 12, 2012

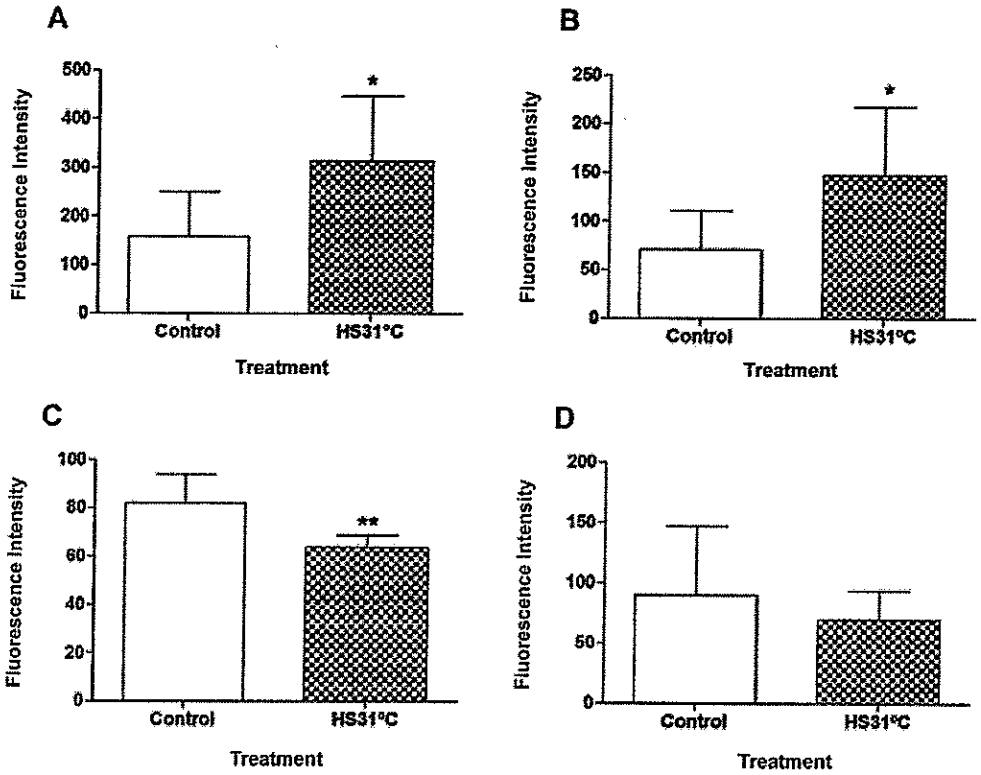


Figure 3. Effects of heat stress (31 ± 1°C) for 10 h (ED_{35}) on the (A) basal oxidative burst and the (B) *S. aureus*–induced oxidative burst. (C) Percentage of cells undergoing phagocytosis and (D) intensity of phagocytosis. Data are presented as the means ± SD (n = 10/group). $^{*}P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$ compared with the control group data (Mann-Whitney U-test).

(36°C for 10 h a day for 5 d) is necessary to decrease relative weights of lymphoid organs.

In this study, we demonstrate that heat stress decreased BW, food intake, and feed conversion ratio of broilers. These data corroborate with those presented by Star et al. (2008), who showed a decrease in BW, food consumption, and egg production in chronic, heat stressed laying hens. Other studies have demonstrated that heat stress affected the performance variables of birds (McKee et al., 1997). A decrease in BW and food intake was reported in laying hens kept at 35°C for 5 wk (Mashaly et al., 2004). This latter study also showed an increased mortality index, a finding duplicated in the acutely heat stressed chickens of the present experiment. Quinteiro-Filho et al. (2010) also demonstrated a decrease in performance variables (BW gain, food consumption, and feed conversion) in long-term heat stressed broiler chickens.

The HPA axis is one of the most important systems for the integration of the body and is activated in response to stressful stimuli or homeostatic disturbances (McEwen, 2000), resulting, among others, in increased plasma corticosterone and in consequent deteriorations in the health status of an animal (Elenkov et al., 2000; Costa-Pinto and Palermo-Neto, 2010; Quinteiro-Filho et al., 2010). Indeed, we showed that the acute heat stress environment increased serum corticosterone. Similarly, increased of corticosterone concentrations also were reported after the exposure of heat stress in chickens (Edens and Siegel, 1976; Debut et al., 2005; Garriga et al., 2006; Quinteiro-Filho et al., 2010).

Activated macrophages demonstrate a large number of morphologic, functional, and metabolic differences from resting cells. They are larger and display a pronounced ruffling of the plasma membrane, an increased capacity for adherence and spreading on surfaces, increased formation of pseudopods, and increased number of picnotic vesicles; they also have functional differences (North, 1978). In the present study, the acute heat stress increased the macrophage basal oxidative burst and the *S. aureus*-induced oxidative burst. Conversely, we previously demonstrated a decrease in the macrophage oxidative burst after long-term heat stress in chickens (Quinteiro-Filho et al., 2010). On the other hand, as reported for other stressors (Dhabhar and McEwen, 1997; Palermo-Neto et al., 2003), the acute heat stress used in the present study decreased the amount of macrophage activity (i.e., the number of macrophages that performed *S. aureus* phagocytosis), a finding that was not observed in our previous study (Quinteiro-Filho et al., 2010). Finally, both acute and long-term heat stress (the present and the later experiments of our group) were unable to modify the number of bacteria phagocytized per mac-

Downloaded from www.journalofanimalscience.org at Sistema Integrado de Bibliotecas daUSP on September 12, 2012

rophage. These observed discrepancies may be due to differences in stress duration and frequency.

In the present experiment, the acute heat stress increased the macrophage oxidative burst. Similarly, separation stress in monkeys (Coe et al., 1988) and conflict stress in mice (Lyte et al., 1990) were shown to stimulate the respiratory burst activity of immune cells. Thus, the present data on the oxidative burst appear to contradict the reported results on macrophage phagocytosis. However, the number of relevant differences reported to exist for the type of cytokine released by activated macrophages or lymphocytes or both under the influence of stress, as well as for cytokine action on macrophage activity, preclude any simplistic interpretation. As described earlier, stress through glucocorticoid hormones modulates the switch between Th1 and Th2 responses (Elenkov et al., 1996; Elenkov and Chrousos, 1999) and thus, the expression, production, and release of pro-inflammatory or anti-inflammatory cytokines (Elenkov and Chrousos, 1999; Webster Marketon and Glaser, 2008).

Reports from this and other laboratories have showed that susceptibility to and recovery from infection, tumor cell inoculation, and autoimmune disorders are strongly influenced by CNS activation states (Palermo-Neto et al., 2003, 2008; Couto-Moraes et al., 2009; Costa-Pinto and Palermo-Neto, 2010). Thus, it seems feasible to suggest that the subtle enteritis observed in the present study in the jejunum of acute heat stressed chickens might be causally related to the decrease in macrophage phagocytosis after stress. Kushima et al. (2003) showed that restraint stress in chickens decreased the NK cell activity, suggesting the observed increase in corticosterone levels was related to the innate immune depression they observed. Khajavi et al. (2003) identified a decrease in CD4+ and CD8+ cells and in SBRC antibody titers in chickens subjected to heat stress (39°C) for 7 h/d for chickens between d 35 to 41 of life. Increases in the heterophil-to-lymphocyte ratio, ultrastructural morphologic changes in heterophil size, shape and granulation as well as lymphocyte cytoplasmatic characteristics were also described in chickens exposed to exogenous corticosterone (Shini et al., 2008). Moreover, Shini et al. (2010) showed that exogenous corticosterone might reduce immune response of chickens.

One of the first manifestations of stress is gastric and intestinal lesions (Cosen-Binker et al., 2004). The normal morphology and integrity of the small intestine is known to be important for nutrient absorption from feed, to prevent bacteria translocation through the intestinal tract for the normal absorption of ingested nutrients. Garriga et al. (2006) showed that acute heat stress increased plasma corticosterone, reduced 22% of jejunum fresh weight and a 5% of jejunum length and, reduced villous length. Moreover, chickens submitted to acute heat stress (30°C/24 h) showed ileal crypt depth reduction, but no changes in villous height or in the villous/crypt ratio (Burkholder et al., 2008). Differences in villous height and villous/crypt ratio changes were also not observed after long-term heat stress (Quinteiro-Filho et al., 2010). Burkholder et al. (2008) determined that the fast intestinal mucosal re-epithelialization reported in chickens was responsible for the lack of these structural changes in stressed chickens.

There are some reports of an inflammatory infiltrate in the jejunum characterized by a predominant number of mononuclear cells featuring enteritis. We have shown an increased number of heterophil cells and a possible bacterial infection in some intestinal samples analyzed (although there was no statistical difference from CON). Thus, it is feasible that this inflammatory infiltrate could have contributed to the pro-inflammatory cytokine release. Cytokines are known to act on the intestinal epithelium tight junctions, increasing the permeability of the intestinal mucosa to pathogenic bacteria and increasing the incidence of intestinal infections (Al-Sadi and Ma, 2007; Al-Sadi et al., 2008). Aside from that, it is possible that the acute heat stress also would have changed the commensal microbiota of the chickens and, as a consequence, host mucosal enterocyte resistance against intestinal pathogens. Indeed, alterations in intestinal microbiota balance are known to reduce the protector mechanisms against pathogen invasion, such as *Salmonella* species (Burkholder et al., 2008). Moreover, the commensal chicken microbiota strongly contributes to the innate and adaptive immune responses (Brisbin et al., 2008). Moreover, the observed enteritis in acutely heat stressed chickens in this study is consistent with the decreased performance indexes they demonstrated, particularly in regard to BW gain. Intestinal inflammation has been previously shown to decrease feed conversion and growth performance in chickens (Liu et al., 2010; Miller et al., 2010).

Altogether, the findings described here strongly suggest that heat stress-induced HPA axis activation and the consequent serum corticosterone increase would have decreased intestinal innate immunitW (such as macrophage phagocytosis), leading to the development of subtle intestinal lesions and decreased performance parameters in stressed chickens. Indeed, although the precise SNS contribution to the observed findings is unknown, rodent models have shown that psychological stressors such as restraint and social disruption lead to stress-induced HPA activation, proinflammatory cytokine modulation, changes in intestinal integrity, and bacterial translocation to the liver and lung (Ando et al., 2000; Bailey et al., 2006; Kiank et al., 2008). Thus, the present data corroborate those reported by others in the field of neuroimmunomodulation and highlight the pivotal importance of heat stress in broilers health and productivity.

Downloaded from www.journalofanimalscience.org at Sistema Integrado de Bibliotecas daUSP on September 12, 2012

LITERATURE CITED

Al-Sadi, R. M., and T. Y. Ma. 2007. IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. J. Immunol. 178:4641–4649.

Al-Sadi, R., D. Ye, K. Dokladny, and T. Y. Ma. 2008. Mechanism of il-1beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. J. Immunol. 180:5653–5661.

Ando, T., R. F. Brown, R. D. Berg, and A. J. Dunn. 2000. Bacterial translocation can increase plasma corticosterone and brain catecholamine and indoleamine metabolism. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 279:R2164–2172.

Avitsur, R., J. L. Stark, F. S. Dhabhar, K. A. Kramer, and J. F. Sheridan. 2003. Social experience alters the response to social stress in mice. Brain Behav. Immun. 17:426–437.

Bailey, M. T., H. Engler, and J. F. Sheridan. 2006. Stress induces the translocation of cutaneous and gastrointestinal microflora to secondary lymphoid organs of c57bl/6 mice. J. Neuroimmunol. 171:29–37.

Bartolomucci, A., P. Palanza, P. Sacerdote, A. E. Panerai, A. Sgoifo, R. Dantzer, and S. Parmigiani. 2005. Social factors and individual vulnerability to chronic stress exposure. Neurosci. Biobehav. Rev. 29:67–81.

Besedovsky, H. O., and A. del Rey. 1996. Immune-neuro-endocrine interactions: Facts and hypotheses. Endocr. Rev. 17:64–102.

Besedovsky, H., E. Sorkin, D. Felix, and H. Haas. 1977. Hypothalamic changes during the immune response. Eur. J. Immunol. 7:323–325.

Blalock, J. E., and E. M. Smith. 2007. Conceptual development of the immune system as a sixth sense. Brain Behav. Immun. 21:23–33.

Brisbin, J. T., J. Gong, and S. Sharif. 2008. Interactions between commensal bacteria and the gut-associated immune system of the chicken. Anim. Health Res. Rev. 9:101–110.

Burkholder, K. M., K. L. Thompson, M. E. Einstein, T. J. Applegate, and J. A. Patterson. 2008. Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to salmonella enteritidis colonization in broilers. Poult. Sci. 87:1734–1741.

Coe, C. L., L. T. Rosenberg, and S. Levine. 1988. Prolonged effect of psychological disturbance on macrophage chemiluminescence in the squirrel monkey. Brain Behav. Immun. 2:151–160.

Cosen-Binker, L. I., M. G. Binker, G. Negri, and O. Tiscornia. 2004. Influence of stress in acute pancreatitis and correlation with stress-induced gastric ulcer. Pancreatology 4:470–484.

Costa-Pinto, F. A., and J. Palermo-Neto. 2010. Neuroimmune interactions in stress. Neuroimmunomodulation 17:196–199.

Couto-Moraes, R., J. Palermo-Neto, and R. P. Markus. 2009. The immune-pineal axis: Stress as a modulator of pineal gland function. Ann. NY Acad. Sci. 1153:193–202.

Dantzer, R. 2001. Cytokine-induced sickness behavior: Mechanisms and implications. Ann. NY Acad. Sci. 933:222–234.

Debut, M., C. Berri, C. Arnould, D. Guemene, V. Sante-Lhoutellier, E. Baeza, N. Jehl, Y. Jego, C. Beaumont, and E. Le Bihan Duval. 2005. Behavioural and physiological responses of three chicken breeds to pre-slaughter shackling and acute heat stress. Br. Poult. Sci. 46:527–535.

Dhabhar, F. S., and B. S. McEwen. 1997. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: A potential role for leukocyte trafficking. Brain Behav. Immun. 11:286–306.

Edens, F. W., and H. S. Siegel. 1976. Modification of corticosterone and glucose responses by sympatholytic agents in young chickens during acute heat exposure. Poult. Sci. 55:1704–1712.

Elenkov, I. J., and G. P. Chrousos. 1999. Stress hormones, th1/th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. Trends Endocrinol. Metab. 10:359–368.

Elenkov, I. J., and G. P. Chrousos. 2002. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. Ann. NY Acad. Sci. 966:290–303.

Elenkov, I. J., D. A. Papanicolaou, R. L. Wilder, and G. P. Chrousos. 1996. Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: Clinical implications. Proc. Assoc. Am. Physic. 108:374–381.

Elenkov, I. J., R. L. Wilder, G. P. Chrousos, and E. S. Vizi. 2000. The sympathetic nerve—An integrative interface between two supersystems: The brain and the immune system. Pharmacol. Rev. 52:595–638.

Garriga, C., R. R. Hunter, C. Amat, J. M. Planas, M. A. Mitchell, and M. Moreto. 2006. Heat stress increases apical glucose transport in the chicken jejunum. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 290:R195–R201.

Hasui, M., Y. Hirabayashi, and Y. Kobayashi. 1989. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. J. Immunol. Methods 117:53–58.

Hodges, R. D. 1974. The histology of the fowl. Academic Press, London, New York.

Khajavi, M., S. Rahimi, Z. M. Hassan, M. A. Kamali, and T. Mousavi. 2003. Effect of feed restriction early in life on humoral and cellular immunity of two commercial broiler strains under heat stress conditions. Br. Poult. Sci. 44:490–497.

Kiank, C., G. Daeschlein, and C. Schuett. 2008. Pneumonia as a long-term consequence of chronic psychological stress in balb/c mice. Brain Behav. Immun. 22:1173–1177.

Kushima, K., M. Fujita, A. Shigeta, H. Horiuchi, H. Matsuda, and S. Furusawa. 2003. Flow cytometric analysis of chicken NK activity and its use on the effect of restraint stress. J. Vet. Med. Sci. 65:995–1000.

Liu, D., Y. Guo, Z. Wang, and J. Yuan. 2010. Exogenous lysozyme influences clostridium perfringens colonization and intestinal barrier function in broiler chickens. Avian Pathol. 39:17–24.

Lyte, M., S. G. Nelson, and M. L. Thompson. 1990. Innate and adaptive immune responses in a social conflict paradigm. Clin. Immunol. Immunopathol. 57:137–147.

Mashaly, M. M. et al. 2004. Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. Poult. Sci. 83:889–894.

Mast, J., B. M. Goddeeris, K. Peeters, F. Vandesande, and L. R. Berghman. 1998. Characterisation of chicken monocytes, macrophages and interdigitating cells by the monoclonal antibody kul01. Vet. Immunol. Immunopathol. 61:343–357.

McEwen, B. S. 2000. The neurobiology of stress: From serendipity to clinical relevance. Brain Res. 886:172–189.

McEwen, B. S., C. A. Biron, K. W. Brunson, K. Bulloch, W. H. Chambers, F. S. Dhabhar, R. H. Goldfarb, R. P. Kitson, A. H. Miller, R. L. Spencer, and J. M. Weiss. 1997. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: Neural, endocrine and immune interactions. Brain Res. Rev. 23:79–133.

McKee, J. S., P. C. Harrison, and G. L. Riskowski. 1997. Effects of supplemental ascorbic acid on the energy conversion of broiler chicks during heat stress and feed withdrawal. Poult. Sci. 76:1278–1286.

Miller, R. W., E. J. Skinner, A. Sulakvelidze, G. F. Mathis, and C. L. Hofacre. 2010. Bacteriophage therapy for control of necrotic enteritis of broiler chickens experimentally infected with clostridium perfringens. Avian Dis. 54:33–40.

Downloaded from www.journalofanimalscience.org at Sistema Integrado de Bibliotecas daUSP on September 12, 2012

North, R. J. 1978. The concept of the activated macrophage. J. Immunol. 121:806–809.

Palermo-Neto, J., C. de Oliveira Massoco, and W. Robespierre de Souza. 2003. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and ehrlich tumor growth. Brain Behav. Immun. 17:43–54.

Palermo-Neto, J., E. S. Fonseca, W. M. Quinteiro-Filho, C. S. Correia, and M. Sakai. 2008. Effects of individual housing on behavior and resistance to ehrlich tumor growth in mice. Physiol. Behav. 95:435–440.

Queiroz Jde, S., C. O. Torello, J. Palermo-Neto, M. C. Valadares, and M. L. Queiroz. 2008. Hematopoietic response of rats exposed to the impact of an acute psychophysiological stressor on responsiveness to an in vivo challenge with listeria monocytogenes: Modulation by chlorella vulgaris prophylactic treatment. Brain Behav. Immun. 22:1056–1065.

Quinteiro-Filho, W. M., A. Ribeiro, V. Ferra de Paula, M. L. Pinheiro, M. Sakai, L. R. M. Sá, A. J. P. Perreira, and J. Palermo-Neto. 2010. Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. Poult. Sci. 89:1905–1914.

Qureshi, M. A., R. R. Dietert, and L. D. Bacon. 1986. Genetic variation in the recruitment and activation of chicken peritoneal macrophages. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 181:560–568.

Riddell, C. 1987. Avian histopathology. 1st ed. American Association of Avian Phathologists, Allen Press, Lawrence, KS.

Selye, H. 1998. A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci. 10:230–231.

Shini, S., G. R. Huff, A. Shini, and P. Kaiser. 2010. Understanding stress-induced immunosuppression: Exploration of cytokine and chemokine gene profiles in chicken peripheral leukocytes. Poult. Sci. 89:841–851.

Shini, S., P. Kaiser, A. Shini, and W. L. Bryden. 2008. Differential alterations in ultrastructural morphology of chicken heterophils and lymphocytes induced by corticosterone and lipopolysaccharide. Vet. Immunol. Immunopathol. 122:83–93.

Star, L., B. Kemp, I. van den Anker, and H. K. Parmentier. 2008. Effect of single or combined climatic and hygienic stress in four layer lines: 1. Performance. Poult. Sci. 87:1022–1030.

Washburn, B. E. M., D. L.; Millspaugh, J. J., Faaborg, J., Schulz, J. H. 2002. Using a commercially available radioimmunoassay to quantify corticosterone in avian plasma. Condor 104:558–563.

Webster Marketon, J. I., and R. Glaser. 2008. Stress hormones and immune function. Cell Immunol. 252:16–26.

Zorrilla, E. P., L. Luborsky, J. R. McKay, R. Rosenthal, A. Houldin, A. Tax, R. McCorkle, D. A. Seligman, and K. Schmidt. 2001. The relationship of depression and stressors to immunological assays: A meta-analytic review. Brain Behav. Immun. 15:199–226.

Downloaded from www.journalofanimalscience.org at Sistema Integrado de Bibliotecas daUSP on September 12, 2012

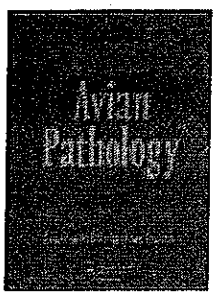
References

This article cites 49 articles, 15 of which you can access for free at:
http://www.journalofanimalscience.org/content/90/6/1986#BIBL

Downloaded from www.journalofanimalscience.org at Sistema Integrado de Bibliotecas daUSP on September 12, 2012

ANEXO C

This article was downloaded by: [Instituto de Pesquisas e Estudos Florest]
On: 12 September 2012, At: 14:21
Publisher: Taylor & Francis
Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Avian Pathology
Publication details, including instructions for authors and subscription information:
http://www.tandfonline.com/loi/cavp20

Heat stress impairs performance and induces intestinal inflammation in broiler chickens infected with Salmonella Enteritidis

W. M. Quinteiro-Filho [a], A. V. S. Gomes [a], M. L. Pinheiro [a], A. Ribeiro [a], V. Ferraz-de-Paula [a], C. S. Astolfi-Ferreira [b], A. J. P. Ferreira [b] & J. Palermo-Neto [a]

[a] Neuroimmunomodulation Research Group, Department of Pathology, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, São Paulo, 05508-270, Brazil

[b] Laboratory of Ornithopathology, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, São Paulo, 05508-270, Brazil

Accepted author version posted online: 19 Jul 2012.Version of record first published: 17 Aug 2012.

To cite this article: W. M. Quinteiro-Filho, A. V. S. Gomes, M. L. Pinheiro, A. Ribeiro, V. Ferraz-de-Paula, C. S. Astolfi-Ferreira, A. J. P. Ferreira & J. Palermo-Neto (2012): Heat stress impairs performance and induces intestinal inflammation in broiler chickens infected with Salmonella Enteritidis, Avian Pathology, DOI:10.1080/03079457.2012.709315

To link to this article: http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2012.709315

OnFirst

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae, and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand, or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

Avian Pathology
2012, 1–7, iFirst article

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Heat stress impairs performance and induces intestinal inflammation in broiler chickens infected with *Salmonella* Enteritidis

W. M. Quinteiro-Filho[1], A. V. S. Gomes[1], M. L. Pinheiro[1], A. Ribeiro[1], V. Ferraz-de-Paula[1], C. S. Astolfi-Ferreira[2], A. J. P. Ferreira[2] and J. Palermo-Neto[1]*

[1]*Neuroimmunomodulation Research Group, Department of Pathology, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, São Paulo 05508-270, Brazil, and* [2]*Laboratory of Ornithopathology, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo 05508-270, São Paulo, Brazil*

Downloaded by [Instituto de Pesquisas e Estudos Florest] at 14:21 12 September 2012

Stressful situations reduce the welfare, production indices and immune status of chickens. *Salmonella* spp. are a major zoonotic pathogens that annually cause over 1 billion infections worldwide. We therefore designed the current experiment to analyse the effects of 31 ± 1°C heat stress (HS) (from 35 to 41 days) on performance parameters, *Salmonella* invasion and small intestine integrity in broiler chickens infected with *Salmonella* Enteritidis. We observed that HS decreased body weight gain and feed intake. However, feed conversion was only increased when HS was combined with *Salmonella* Enteritidis infection. In addition, we observed an increase in serum corticosterone levels in all of the birds that were subjected to HS, showing a hypothalamus–pituitary–adrenal axis activation. Furthermore, mild acute multifocal lymphoplasmacytic enteritis, characterized by foci of heterophil infiltration in the duodenum, jejunum and ileum, was observed in the HS group. In contrast, similar but more evident enteritis was noted in the heat-stressed and *Salmonella*-infected group. In this group, moderate enteritis was observed in all parts of the small intestine. Lastly, we observed an increase in *Salmonella* counts in the spleens of the stressed and *Salmonella*-infected chickens. The combination of HS and *Salmonella* Enteritidis infection may therefore disrupt the intestinal barrier, which would allow pathogenic bacteria to migrate through the intestinal mucosa to the spleen and generate an inflammatory infiltrate in the gut, decreasing performance parameters.

Introduction

Stresses in poultry production are a reality. Climatic, environmental, nutritional, social and psychological stresses have been reported to reduce animal welfare, performance indices and immunological parameters (Bartlett & Smith, 2003; Palermo-Neto *et al.*, 2003; Mashaly *et al.*, 2004; Star *et al.*, 2008a, b; Quinteiro-Filho *et al.*, 2010, 2012). A high ambient temperature is one of the most relevant stressors in poultry production. Heat stress (HS) is known to depress the growth rate and to reduce the net yield of commercial broiler chickens (Cahaner & Leenstra, 1992; Yalcin *et al.*, 1997; Syafwan *et al.*, 2011). Apart from inducing a high mortality rate and decreasing both feed intake and body weight gain, HS appears to affect intestinal development negatively (Mitchell & Carlisle, 1992; Garriga *et al.*, 2006), especially the integrity of the intestinal epithelium (Saunders *et al.*, 1994; Meddings & Swain, 2000; Soderholm & Perdue, 2001; Quinteiro-Filho *et al.*, 2010). The intestinal mucosa is continuously exposed to a heavy load of antigenic molecules from ingested food and microorganisms, such as resident and invading bacteria and viruses (Keita & Soderholm, 2010). If the intestinal barrier is disturbed, antigen and bacterial passage may therefore increase, thereby damaging the mucosa and leading to pathological conditions (Keita & Soderholm, 2010). Stressors have been reported to enhance the risk of infectious diseases and to influence their severity (Glaser & Kiecolt-Glaser, 2005). Environmental stressors have also been reported to influence the intestinal colonization of enteric pathogens in birds, which is an event that facilitates the horizontal transmission of pathogens between birds. This horizontal spread increases pathogen shedding and contributes to carcass contamination during the processing phase (Rigby & Pettit, 1980; Bailey, 1988; Isaacson *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2001). Moreover, stress-induced perturbation of the integrity of the gut epithelium reduces the efficacy of the birds' innate protective mechanisms and may increase the potential for pathogens, such as *Salmonella* spp., to bind to and colonize the intestinal epithelium (Burkholder *et al.*, 2008).

In our previous studies, we demonstrated that acute and chronic 31°C HS from experimental day $(ED)_{35}$ to ED_{41} increased corticosterone serum levels, impaired

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +55 11 30917957. Fax: +55 11 30917829. E-mail: jpalermo@usp.br
Received 2 February 2012
ISSN 0307-9457 (print)/ISSN 1465-3338 (online)/12/000001-07 © 2012 Houghton Trust Ltd
http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2012.709315

performance parameters, induced intestinal inflammation and reduced macrophage activity (Quinteiro-Filho *et al.*, 2010, 2012). These findings were hypothesized to be a consequence of HS-induced hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis activation (the HPA axis, the major stress system in the body, is a neuroendocrine system involved in the production of the stress hormone corticosterone by the adrenal glands [Glaser & Kiecolt-Glaser, 2005]). However, in these previous reports we did not analyse the relationship between HS and intestinal integrity following a pathogenic challenge; for example, with *Salmonella* spp.

The objective of the present study was thus to determine the influence of 6 days of HS (31 ± 1°C) on performance parameters and small intestine integrity in broiler chickens that were experimentally infected with *Salmonella* Enteritidis.

Downloaded by [Instituto de Pesquisas e Estudos Florest] at 14:21 12 September 2012

Materials and Methods

Chickens. One-day-old broiler chicks were housed in climate-controlled rooms at the Experimental Center of Avian Pathology, School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Brazil.

A total of 360 male broiler chickens were studied. The birds were obtained from a *Salmonella*-free hatchery that was supplied with eggs from *Salmonella*-controlled breeding flocks. The chicks were housed in floor pens covered with sterilized and contaminant-free wood shavings. The birds were housed at a density of 10 birds/m^2 with water and food (hanging feeders) provided *ad libitum*. The broiler chickens were constantly observed for health status and behaviour. The transport boxes and housing environments were tested according to ISO 6579:2002/Amd 1:2007 (ISO, 2007). Additionally, transport box samples, wood shavings and house environment swabs were pre-enriched in Difco tetrathionate broth (BD Difco™, Sparks, Maryland, USA) and cultured on Difco xyloselysine-deoxycholate agar with xylose-lysine-tergitol-4 (XLT4) for the detection of *Salmonella* Enteritidis. No evidence of *Salmonella* was detected in the transport boxes or in the bird house environment. The birds were maintained and used in accordance with the guidelines of the Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources from The School of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Brazil (Protocol No. 1798/2009).

Heat stress and group formation. From days 1 to 35 of life (ED_1 to ED_{35}), the birds were maintained in a recommended environmental temperature (33 ± 1°C from ED_1 to ED_7, 28 ± 1°C from ED_7 to ED_{21} and 24 ± 1°C from ED_{21} to ED_{35}). On ED_1, the broiler chickens were weighed and reallocated into four different groups: a control group (Group C), a positive *Salmonella* control group (Group PC), a negative *Salmonella* HS group (Group NHS31°C) and a positive *Salmonella* HS group (Group PHS31°C). From ED_{35} to ED_{42}, the birds in the control groups (C and PC) were maintained at an environmental temperature of 21 ± 1°C for the entire day. The chickens in the two heat-stressed groups (NHS31°C and PNHS31°C) were maintained under environmental HS. The HS (31 ± 1°C) was applied once daily (from 8:00 am to 6:00 pm = 10 h/day) for six of the experimental days (ED_{35} to ED_{41}). From 6:00 pm to 8:00 am, the environmental temperature of the heat-stressed groups (NHS31°C and PNHS31°C) was reduced to 21 ± 1°C; that is, equal to the temperature of the control groups. On ED_{42}, birds were killed and the experimental procedures were performed.

***Salmonella* Enteritidis infection.** On ED_1, all of the birds from the PC and PHS31°C groups were challenged with 0.1 ml Difco® brain heart infusion containing 10^6 colony-forming units/ml *Salmonella* Enteritidis. The birds in the NC and NHS31°C groups received sterile brain heart infusion. After 42 days (ED_{42}), caecal colonization and organ invasion were analysed in birds from the PC and the PHS31°C groups using microbiological techniques. The birds were independently housed in climate-controlled rooms following the challenge.

Performance parameters. Broiler chicken performance was assessed in terms of mortality rate, body weight gain, feed consumption per bird and feed conversion. The feed conversion ratio was calculated on the basis of the feed/gain ratio for each replicate. For each group, five replicates of 12 birds per box were analysed. The data were collected during the experimental period (ED_{35} to ED_{42}).

Organ harvest. On ED_{42}, 20 birds per group were randomly selected and killed by cervical dislocation immediately after weighing. At necropsy, the caecum, liver and spleen were harvested for *Salmonella* Enteritidis analysis. Ten birds per group were selected, and the small intestines were harvested (duodenum, jejunum and ileum) and fixed in a 10% neutral buffered formalin solution for histological analyses.

Caecal colonization and organ invasion by *Salmonella*. To investigate the presence of *Salmonella* Enteritidis in the caeca, liver, and spleen of the challenged birds, tissue samples were taken for culture from 20 birds from the PC and PHS31°C groups on ED_{42}.

To examine caecal colonization, the entire caecum was removed aseptically, placed in a sterile bag, weighed, and diluted 1:10 with a sterile solution of 0.1% peptone in water. One hundred microlitres were spread on the XLT4 agar (Difco) and incubated at 37°C for 24 h. Caecal *Salmonella* Enteritidis counts were performed by counting the resultant colonies on the XLT4 agar. In the cases where bacterial growth was detected, a series of biochemical and serological confirmatory tests were performed.

To determine organ invasion following the challenge, liver and spleen samples were taken from the birds of each experimental group. The samples were appropriately removed, and the liver and spleen weights were recorded. The organs were then homogenized separately. The homogenates of each organ were diluted 1:10 with a sterile solution of 0.1% peptone water, and 100 µl was spread on XLT4 agar, as described above. Organ invasion was evaluated via enumeration of the *Salmonella* Enteritidis bacteria in both the liver and spleen samples using the method described above.

To confirm the absence of *Salmonella* Enteritidis in the negative samples, these samples were placed in a tetrathionate broth (1:10), incubated at 37°C for 48 h and streaked on XLT4 agar. This verification of the absence of *Salmonella* Enteritidis was performed by counting the resultant bacterial colonies on the XLT4 agar. The birds in the NC and HS31°C groups were similarly tested to confirm the absence of *Salmonella* Enteritidis.

Intestinal morphology. Light microscopy specimens were taken from several sites within the segments of the small bowel. The intestinal segments were defined by the following anatomic limits: the length of the duodenum (from the gizzard [duodenum ostium] to the beginning of the mesentery [duodenum loop]); the length of the jejunum (from the most distal point of insertion of the mesentery to 5 cm before Meckel's diverticulum); and the length of the ileum (from 5 cm after Meckel's diverticulum to the ileo-caecal junction). The tissues were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, cut to a thickness of 4 to 5 µm and stained with haematoxylin and eosin for light microscopy. All of the slides were examined for pathological changes by two different pathologists who were blinded to the group affiliation; a high positive correlation was observed between their evaluations.

The following histological parameters were analysed: villous height, crypt morphology and depth, the villous height:crypt depth ratio, the intensity and the composition of the inflammatory infiltrate in the lamina propria and the number of intraepithelial lymphocytes per 100 enterocytes. The severity of the small intestinal lesions was scored semi-quantitatively from 0 to 3 (where 0 = control material, 1 = mild alteration, 2 = moderate alteration and 3 = severe alteration). The criteria used to define normal histology were those given by Hodges (1974) and Riddell (1987).

Serum corticosterone determination. Ten birds per group were randomly selected, and 2 ml blood samples were drawn from their brachial veins over a period of 30 sec to 1 min. The corticosterone concentrations were measured on ED_{42} between 08:00 am and 10:00 am. Whole blood was used to collect the serum for the corticosterone assays. The corticosterone

Downloaded by [Instituto de Pesquisas e Estudos Florest] at 14:21 12 September 2012

serum concentrations were determined using a corticosterone enzyme-linked immunosorbent assay (Enzo® Life Science, Farmingdale, New York, USA), as described by Tachibana *et al.* (2007).

Statistical analyses. All of the statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA). The parametric data were analysed using a two-way analysis of variance test followed by Student–Newman–Keuls' test. The Mann–Whitney *U* test was used to compare non-parametric data from two different groups. $P<0.05$ was considered significant for all of the comparisons. The data are presented as the mean ± standard deviation.

Results

Performance parameters. All of the performance parameters were severely affected in chickens submitted once daily (10 h daily) to 31°C HS from ED_{35} to ED_{41} (Table 1). HS decreased body weight gain ($F=120.73$; $P<0.01$) and food consumption (g/bird) ($F=102.69$; $P<0.01$) in *Salmonella*-infected (Group PHS31°C) and non-infected (Group NHS31°C) birds. With respect to feed conversion, an interaction between HS and *Salmonella* infection ($F=9.61$; $P=0.008$) was observed. Indeed, although HS (Group NHS31°C) alone did not affect the feed conversion compared with the control birds ($P>0.05$), those birds that were subjected to HS and infected with *Salmonella* Enteritidis (Group PHS31°C) exhibited an increased feed conversion compared with those birds in the PC and NHS31°C groups ($F=14.33$; $P<0.01$). There was no mortality in any group.

Serum corticosterone determination. As illustrated in Figure 1, the birds in the NHS31°C and PHS31°C groups exhibited high corticosterone levels compared with the NC and PC groups (Group C, 254.9 ± 78.27 pg/ml; Group NHS31°C, 467.39 ± 132.00 pg/ml; Group PC, 285.00 ± 70.33 pg/ml; Group PHS31°C, 442.5 ± 91.31 pg/ml; $F=39.87$; $P<0.01$). No significant differences were observed in this metric between the NHS31°C and PHS31°C groups.

Intestinal histology. Histological intestinal changes were not observed in any of the chickens in the negative control (Group C). There were no alterations in the morphology (i.e. the crypt depth:villus height ratio, the villus height, the crypt depth and the number of intraepithelial lymphocytes) of the duodenum, jejunum or ileum mucosa between the four groups. However, a mild increase in the cellularity of the lamina propria was observed in the birds of the PC and NHS31°C groups. This increase in cellularity was characterized by mild acute multifocal lympho-plasmocytic enteritis and foci of heterophil infiltrates in the duodenum, jejunum and ileum (Groups NHS31°C and PC showed this in seven out of 10 samples; $P<0.05$); however, histological differences between these groups were not detected. In contrast, birds in the PHS31°C group exhibited moderate and diffuse multifocal lympho-plasmocytic enteritis with moderate foci of heterophil infiltration in all parts of small intestine (PHS31°C showed this in eight out of 10 samples; $P<0.05$). Figure 2 illustrates these alterations.

Caecal colonization and organ invasion by *Salmonella*. The data in Table 2 demonstrate that no positive counts of *Salmonella* Enteritidis were observed in the caecum or the liver samples from either Group PC or Group PHS31°C. Following the tetrathionate broth test, a small number of positive samples were identified, thereby confirming the presence of *Salmonella* Enteritidis infection. No differences in caecal colonization were observed between the PC and PHS31°C groups. However, HS increased splenic *Salmonella enteritis* invasion in the birds in the PHS31°C group ($P<0.05$) compared with those in the PC group. No positive *Salmonella* Enteritidis counts were observed in either the NC or NHS31°C groups.

Discussion

The results of this study indicate that chronic 31°C HS applied for 10 h daily from days 35 to 41 of life decreased performance parameters and induced enteritis in broiler chickens. When the chickens were heat stressed and infected with *Salmonella* Enteritidis, we observed an increase in feed conversion and moderate enteritis throughout the small intestine. We also observed an increase in splenic invasion by *Salmonella* Enteritidis when stressed broiler chickens were challenged with this pathogenic bacterium.

The central nervous system, the endocrine system and the immune system are complex and interact with one other; various stressors can cause dysregulation of the immune response by affecting the interplay between these systems (Glaser & Kiecolt-Glaser, 2005; Costa-Pinto & Palermo-Neto, 2010). Stress-induced activation of the HPA axis influences the immune system via the release of neuroendocrine hormones from the pituitary gland. Immune cells are able to respond to signals from the HPA axis and become either activated or downregulated (Webster Marketon & Glaser, 2008). In addition, these immune cells have receptors for the catecholamines epinephrine and norepinephrine. These receptors enable immune cells to respond to signals from the sympathetic–adrenal medullary axis (Glaser & Kiecolt-Glaser, 2005). Immune cells can also be stimulated to release cytokines

Table 1. *Effects of heat stress (31 ± 1°C) on the performance parameters of broiler chickens infected with* Salmonella *Enteritidis.*

Performance parameter	Group C	Group NHS31°C	Group PC	Group PHS31°C
Body weight gain (g)	622.70 ± 39.23	442.50 ± 44.81*	618.5 ± 23.85	374.7 ± 49.22**
Feed intake (g)	1449 ± 51.12	1139 ± 84.47*	1337 ± 29.35	1017 ± 78.63**
Feed conversion	2.45 ± 0.14	2.51 ± 0.20	2.16 ± 0.04	2.73 ± 0.23**[a]
Mortality (%)	0	0	0	0

Results are the mean ± standard deviation of five replicates ($n=5$) with 12 chickens per group. *$P<0.01$ compared with the control group (negative *Salmonella*). **$P<0.01$ compared with the control group (positive *Salmonella*). [a]$P<0.01$ compared with the NHS 31°C group (negative *Salmonella*). Parametric data: two-way analysis of variance followed by a Student–Newman–Keuls test.

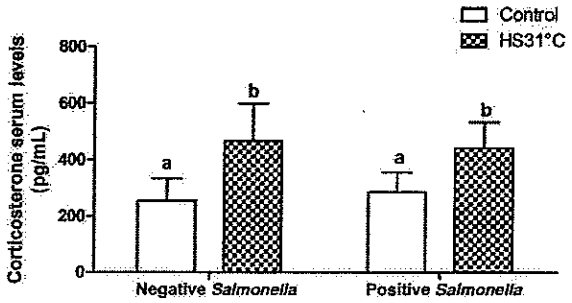


Figure 1. *Effects of heat stress (31 ± 1°C) for 10 h daily from ED35 to ED41 on corticosterone serum levels (pg/ml) in broiler chickens that were infected or not infected with* Salmonella *Enteritidis. Data presented as mean ± standard deviation (n = 10/ group). Different letters above the columns indicate statistically significant differences (P < 0.05, two-way analysis of variance followed by a Student–Newman–Keuls test).*

such as interleukin-1, which, in turn, stimulates the increased production of corticotrophin-releasing hormone by the hypothalamus. Corticotrophin-releasing hormone promotes the release of adrenocorticotropic hormone and corticosterone from the pituitary gland and the adrenal cortex, respectively (Yang & Glaser, 2002). These "stress" hormones can subsequently dysregulate immune responses and may be potentially harmful to the health of the organism. Indeed, the present findings demonstrate increased corticosterone levels in heat-stressed birds, a finding that corroborates our previous work (Quinteiro-Filho *et al.*, 2010, 2012).

Given these facts, our findings reinforce the idea that the decreased performance observed in stressed broiler chickens may be related to alterations in HPA axis function by released corticosterone (Gupta *et al.*, 2007; Kranendonk *et al.* 2008; Shini *et al.*, 2009; Quinteiro-Filho *et al.*, 2010). Indeed, HS decreased weight gain and feed intake in NHS31°C chickens. Within this context, we observed that stressed chickens challenged with *Salmonella* Enteritidis (Group PHS31°C) exhibited increased feed conversion compared with birds that were only subjected to HS (Group NHS31°C) or that were only infected with *Salmonella* (Group PC). These interesting and relevant results demonstrate a positive relationship between HS and *Salmonella* Enteritidis infection.

In this context, corticosterone may act in the hypothalamic nuclei that regulate food intake and satisfaction, causing a decrease in both food consumption and body weight gain (Costa-Pinto *et al.*, 2009). In addition, the observed intestinal inflammation may induce the release of certain interleukins (i.e. interleukin-1β) that have been reported to induce sickness-related behaviours in birds (Johnson, 1998; Dantzer, 2001; Costa-Pinto *et al.*, 2009). A classical sickness-related behaviour is reduced feed intake, which that might explain the decreased performance parameters we observed in the present analysis. It should be noted that nutrient absorption may also have been altered in these experiments by the observed intestinal lesions, which developed due to the applied stressor and/or the bacteria infection (Mitchell & Carlisle, 1992; Burkholder *et al.*, 2008; Quinteiro-Filho *et al.*, 2010).

The intestinal mucosa has been noted as the first line of defence against ingested pathogens, such as *Salmonella* (Fagarasan & Honjo, 2003; Fagarasan, 2006). Following infection with several serovars, the

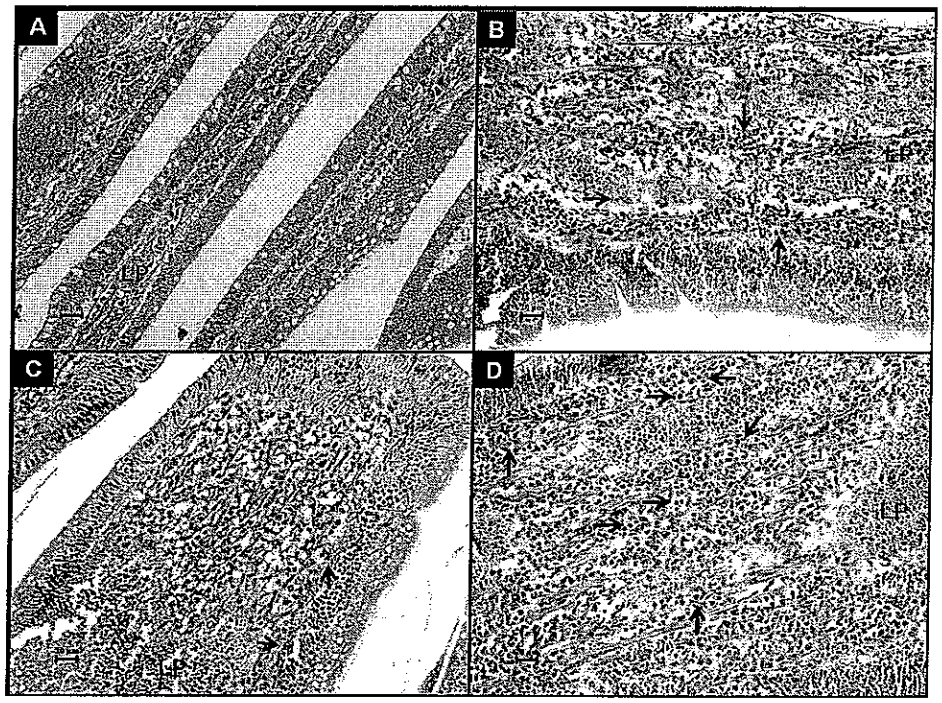


Figure 2. *Histology of broiler chicken small intestine. 2a: Jejunum mucosa of the control broiler chicken group (Group C). 2b: Jejunum mucosa of the negative 31 ± 1°C HS broiler chicken group (Group NHS31°C) with mild acute lymphoplasmacytic enteritis in the lamina propria (LP). 2c: Jejunum mucosa of the positive control broiler chicken group (Group PC) with mild acute lymphoplasmacytic enteritis in the LP. 2d: Jejunum mucosa of the negative 31 ± 1°C heat stress broiler chicken group (Group PHS31°C) with moderate acute lymphoplasmacytic enteritis in the LP. Black arrows, Black arrows, foci of heterophils. Haematoxylin and eosin staining. Scale bar = 20 μm.*

Downloaded by [Instituto de Pesquisas e Estudos Florest] at 14:21 12 September 2012

Table 2. *Effects of HS (31 ± 1°C) on the intestinal colonization and organ invasion of broiler chickens infected with* Salmonella *Enteritidis.*

	Mean *Salmonella* count (CFU/g)[a]			Positive control (tetrathionate broth)[b]		
Group	Caecum	Liver	Spleen[c]	Caecum	Liver	Spleen
C	0	0	0	0/20	0/20	0/20
NHS31°C	0	0	0	0/20	0/20	0/20
PC	0	0	4.70 ± 3.20	12/20	2/20	8/20
PHS31°C	0	0	18.37 ± 10.47*	11/20	2/20	9/20

[a]No *Salmonella* bacteria were detected in the caecum or liver samples (XLT4 agar). [b]The samples were enriched in tetrathionate broth and streaked on XLT4 agar (positives/total). [c]$n = 8$ samples, non-parametric data. *$P < 0.05$ compared with the PC group (Mann–Whitney U test). CFU, colony-forming units.

primary sites of *Salmonella* spp. colonization are the large blind caeca that branch off the distal ileum immediately prior to the colon. Following invasion, *Salmonella* spp. are believed to be taken up by macrophages or dendritic cells and subsequently transported via the lymphatic system to the spleen and the liver (Mastroeni & Menager, 2003; Chappell *et al.*, 2009). Thus, the interaction between *Salmonella* spp. and macrophages is a key to the progression of systemic infection in both mammals and birds (Barrow *et al.*, 1994). In this respect, Quinteiro-Filho *et al.* (2010) demonstrated that the same HS protocol used in the present experiment decreased macrophage activity in broiler chickens, as evidenced by a decreased oxidative burst. Other results obtained in our laboratory revealed that different stressors, such as unavoidable electrical footshock, chemical stressors and individual housing, also decreased macrophage activity in mice (Fonseca *et al.* 2002; Palermo-Neto *et al.*, 2003, 2008; Quinteiro-Filho *et al.*, 2009; Righi *et al.*, 2009). Therefore, it appears plausible that HS decreased the microbicidal activity of macrophages in this model, allowing the intracellular bacteria to survive in the macrophages of the chickens in the PHS31°C group. If bacterial replication is not controlled by innate immunity, *Salmonella* is able to reach and replicate within several organs (e.g., the spleen, as was observed in this model), thereby establishing a systemic infection (Burkholder *et al.*, 2008; Chappell *et al.*, 2009).

Furthermore, Kiank *et al.* (2008) demonstrated that commensal bacteria migrated to lymphoid organs and the liver in stressed mice. In their study, bacterial migration was related to immune dysfunction in the intestinal barrier. These authors also reported that chronically stressed mice spontaneously suffered from increased bacterial load in the liver and lung, a condition that was sustained for up to 10 days following the termination of the stress exposure and which contributed to pneumonia (Kiank *et al.*, 2008). Moreover, induced stress in rats and mice increases their susceptibility to *Salmonella* (Kuriyama *et al.*, 1996). Stress was also shown to facilitate bacterial translocation from the mucosal intestinal barrier in mice (Humphrey, 2006).

Many authors have reported that HS affects the integrity of the intestinal barrier, which is composed of enterocytes, tight junctions, secreted mucus and immune cells, such as macrophages (Lambert *et al.*, 2002; Prosser *et al.*, 2004; Singleton & Wischmeyer, 2006; Chappell *et al.*, 2009; Lambert, 2009). The loss of intestinal barrier integrity leads to increased intestinal permeability, inducing local intestinal inflammation (Chappell *et al.*, 2009). Indeed, Quinteiro-Filho *et al.* (2010) demonstrated that HS induced enteritis in the jejunum of broiler chickens. Our data are in agreement with and strengthen our previous findings. We demonstrated mild enteritis in heat-stressed birds (Group NHS31°C). This inflammation was characterized by increased lympho-plasmacytic inflammatory infiltrates in all regions of the small intestine (duodenum, jejunum and ileum). We also observed increased, moderate enteritis throughout the small intestine in the birds that were both stressed and infected with *Salmonella* Enteritidis (Group PHS31°C). The presence of heterophils in the observed inflammatory infiltrate reflects the bacterial invasion from the epithelium to the lamina propria of the villi. Another important finding was the presence of an increased area of inflammation in the intestines of the birds that were both stressed and infected with *Salmonella*. This inflammation was characterized by a larger number of villi and crypts that exhibited prominent inflammatory infiltrates (data not shown). In the non-infected heat-stressed birds (Group NHS31°C) and the positive control birds (Group PC), only a mild lympho-plasmacytic heterophil infiltration was observed; that is, large intact areas were observed throughout the intestinal mucosa.

The observed increase in inflammatory infiltration could have contributed to the increased production of proinflammatory cytokines (i.e. interleukin-1). These cytokines may have acted in the intestinal epithelium's tight junctions, increasing the permeability of the mucosa to the pathogenic bacteria (Al-Sadi & Ma, 2007; Al-Sadi *et al.*, 2008). In addition, it should be noted that HS may have also modified the presence and/or activity of the commensal microbiota, thereby leading to a loss of protection against pathogenic microorganism colonization. This loss of protection could reflect a competition between the pathogenic and commensal bacteria for binding of intestinal cell receptors, the increased demand for nutrients and the production of bacteriocins (Brisbin *et al.*, 2008; Burkholder *et al.*, 2008). Disturbances in the balance of the intestinal microbiota can diminish the efficacy of the protective mechanisms that fight off invading pathogenic bacteria, such as *Salmonella* Enteritidis (Burkholder *et al.*, 2008; Lambert, 2009).

Finally, it should not be forgotten that bidirectional signalling between the gastrointestinal tract and the brain is regulated by the central nervous system, the neuroendocrine and neuroimmune systems, the sympathetic and parasympathetic arms of the autonomic nervous system, including the enteric nervous system, and the intestinal microbiota (Grenham *et al.*, 2011).

Downloaded by [Instituto de Pesquisas e Estudos Florest] at 14:21 12 September 2012

Neuroimmune–epithelial interactions play a protective role in the intestines that ultimately ensure the preservation of the epithelial barrier functions and the expulsion of noxious agents from the gut (Bueno, 2000; Sharkey & Mawe, 2002). When the mucosal defence breaks down, such as during stress or during a bacterial or parasitic infection, the enteric arm of the autonomic nervous system is actively involved in responding to this challenge (Sharkey & Mawe, 2002). Indeed, increased noradrenaline is believed to be associated with increased bacterial translocation from the gut (Hart & Kamm, 2002).

In conclusion, chronic 31°C HS applied from days 35 to 41 of life may have activated the chicken HPA axis, increasing corticosterone serum levels and inducing intestinal cytokine production. In turn, these events may have decreased both food intake and body weight gain. Furthermore, HS may act via HPA axis and/or the enteric nervous system to influence the quality of the intestinal immune barrier. This effect would allow pathogenic bacteria to migrate through the intestinal mucosa and result in inflammatory infiltration, decreasing nutrient absorption. Moreover, a decrease in macrophage activity may be involved in the high number of *Salmonella* bacteria that were observed in the spleen of heat-stressed and infected broiler chickens. Together, the present data strengthen the notion that welfare control and distress avoidance in poultry production are relevant factors for the maintenance of intestinal integrity, satisfactory performance indices and *Salmonella* infection prevention.

Downloaded by [Instituto de Pesquisas e Estudos Florest] at 14:21 12 September 2012

Acknowledgements

This research was supported by the FAPESP Foundation (Process Nos 2009/51886–3 and 2009/52487-5) and the CNPq (Process Nos 470776/2009-9 and 300764/2010-3), to which the authors wish to express their sincere gratitude. The authors would also like to thank Adriana Tiemi Akamine for helping with the histological images.

References

Al-Sadi, R., Ye, D., Dokladny, K. & Ma, T.Y. (2008). Mechanism of IL-1β-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *Journal of Immunology*, 180, 5653–5661.

Al-Sadi, R.M. & Ma, T.Y. (2007). IL-1β causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *Journal of Immunology*, 178, 4641–4649.

Bailey, J.S. (1988). Integrated colonization control of salmonella in poultry. *Poultry Science*, 67, 928–932.

Barrow, P.A., Huggins, M.B. & Lovell, M.A. (1994). Host specificity of *Salmonella* infection in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system. *Infection and Immunity*, 62, 4602–4610.

Bartlett, J.R. & Smith, M.O. (2003). Effects of different levels of zinc on the performance and immunocompetence of broilers under heat stress. *Poultry Science*, 82, 1580–1588.

Brisbin, J.T., Gong, J. & Sharif, S. (2008). Interactions between commensal bacteria and the gut-associated immune system of the chicken. *Animal Health Research Review*, 9, 101–110.

Bueno, L. (2000). Neuroimmune alterations of ENS functioning. *Gut*, 47, 63–65.

Burkholder, K.M., Thompson, K.L., Einstein, M.E., Applegate, T.J. & Patterson, J.A. (2008). Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to *Salmonella* Enteritidis colonization in broilers. *Poultry Science*, 87, 1734–1741.

Cahaner, A. & Leenstra, F. (1992). Effects of high temperature on growth and efficiency of male and female broilers from lines selected for high weight gain, favorable feed conversion, and high or low fat content. *Poultry Science*, 71, 1237–1250.

Chappell, L., Kaiser, P., Barrow, P., Jones, M.A., Johnston, C. & Wigley, P. (2009). The immunobiology of avian systemic salmonellosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128, 53–59.

Costa-Pinto, F.A., Cohn, D.W., Sa-Rocha, V.M., Sa-Rocha, L.C. & Palermo-Neto, J. (2009). Behavior: a relevant tool for brain-immune system interaction studies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1153, 107–119.

Costa-Pinto, F.A. & Palermo-Neto, J. (2010). Neuroimmune interactions in stress. *Neuroimmunomodulation*, 17, 196–199.

Dantzer, R. (2001). Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 933, 222–234.

Fagarasan, S. (2006). Intestinal IgA synthesis: a primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 308, 137–153.

Fagarasan, S. & Honjo, T. (2003). Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nature Reviews. Immunology*, 3, 63–72.

Fonseca, E.S., Massoco, C.O. & Palermo-Neto, J. (2002). Effects of prenatal stress on stress-induced changes in behavior and macrophage activity of mice. *Physiology Behavior*, 77, 205–215.

Garriga, C., Hunter, R.R., Amat, C., Planas, J.M., Mitchell, M.A. & Moreto, M. (2006). Heat stress increases apical glucose transport in the chicken jejunum. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 290, 195–201.

Glaser, R. & Kiecolt-Glaser, J.K. (2005). Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nature Reviews. Immunology*, 5, 243–251.

Grenham, S., Clarke, G., Cryan, J.F. & Dinan, T.G. (2011). Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Frontiers in Physiology*, 2, 15.

Gupta, S., Earley, B. & Crowe, M.A. (2007). Pituitary, adrenal, immune and performance responses of mature Holstein × Friesian bulls housed on slatted floors at various space allowances. *Veterinary Journal*, 173, 594–604.

Hart, A. & Kamm, M.A. (2002). Review article: mechanisms of initiation and perpetuation of gut inflammation by stress. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 16, 2017–2028.

Hodges, R.D. (1974). *The Histology of the Fowl*. London: Academic Press.

Humphrey, T. (2006). Are happy chickens safer chickens? Poultry welfare and disease susceptibility. *British Poultry Science*, 47, 379–391.

Isaacson, R.E., Firkins, L.D., Weigel, R.M., Zuckermann, F.A. & DiPietro, J.A. (1999). Effect of transportation and feed withdrawal on shedding of *Salmonella typhimurium* among experimentally infected pigs. *The American Journal of Veterinary Research*, 60, 1155–1158.

ISO. (2007). *ISO 6579:2002/Amd 1:2007 Annex d: Detection of Salmonella spp. in Animal Faces and in Environmental Samples from the Primary Production Stage*. Geneva: International Organization for Standardization.

Johnson, R.W. (1998). Immune and endocrine regulation of food intake in sick animals. *Domestic Animal Endocrinology*, 15, 309–319.

Jones, P.H., Roe, J.M. & Miller, B.G. (2001). Effects of stressors on immune parameters and on the faecal shedding of enterotoxigenic *Escherichia coli* in piglets following experimental inoculation. *Research in Veterinary Science*, 70, 9–17.

Keita, A.V. & Soderholm, J.D. (2010). The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterology and Motility*, 22, 718–733.

Kiank, C., Daeschlein, G. & Schuett, C. (2008). Pneumonia as a long-term consequence of chronic psychological stress in BALB/c mice. *Brain, Behavior and Immunity*, 22, 1173–1177.

Kranendonk, G., Mulder, E.J., Parvizi, N. & Taverne, M.A. (2008). Prenatal stress in pigs: experimental approaches and field observations. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 116, 413–422.

Kuriyama, T., Machida, K. & Suzuki, K. (1996). Importance of correlations between phagocytic activity and superoxide production of neutrophils under conditions of voluntary exercise and stress. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 10, 458–464.

Lambert, G.P. (2009). Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects. *Journal of Animal Science*, 87, 101–108.

Lambert, G.P., Gisolfi, C.V., Berg, D.J., Moseley, P.L., Oberley, L.W. & Kregel, K.C. (2002). Selected contribution: hyperthermia-induced intestinal permeability and the role of oxidative and nitrosative stress. *Journal of Applied Physiology*, 92, 1750–1761.

Mashaly, M.M., Hendricks, G.L., 3rd, Kalama, M.A., Gehad, A.E., Abbas, A.O. & Patterson, P.H. (2004). Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. *Poultry Science*, 83, 889–894.

Mastroeni, P. & Menager, N. (2003). Development of acquired immunity to *Salmonella*. *Journal of Medical Microbiology*, 52, 453–459.

Meddings, J.B. & Swain, M.G. (2000). Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat. *Gastroenterology*, 119, 1019–1028.

Mitchell, M.A. & Carlisle, A.J. (1992). The effects of chronic exposure to elevated environmental temperature on intestinal morphology and nutrient absorption in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology*, 101, 137–142.

Palermo-Neto, J., de Oliveira Massoco, C. & Robespierre de Souza, W. (2003). Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Brain, Behavior, and Immunity*, 17, 43–54.

Palermo-Neto, J., Fonseca, E.S., Quinteiro-Filho, W.M., Correia, C.S. & Sakai, M. (2008). Effects of individual housing on behavior and resistance to Ehrlich tumor growth in mice. *Physiology & Behavior*, 95, 435–440.

Prosser, C., Stelwagen, K., Cummins, R., Guerin, P., Gill, N. & Milne, C. (2004). Reduction in heat-induced gastrointestinal hyperpermeability in rats by bovine colostrum and goat milk powders. *Journal of Applied Physiology*, 96, 650–654.

Quinteiro-Filho, W.M., Ribeiro, A., Ferraz-de-Paula, V., Pinheiro, M.L., Sakai, M., Sa, L.R., Ferreira, A.J. & Palermo-Neto, J. (2010). Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. *Poultry Science*, 89, 1905–1914.

Quinteiro-Filho, W.M., Righi, D.A. & Palermo-Neto, J. (2009). Effect of cyhalothrin on Ehrlich tumor growth and macrophage activity in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42, 912–917.

Quinteiro-Filho, W.M., Rodrigues, M.V., Ribeiro, A., Ferraz-de-Paula, V., Pinheiro, M.L., Sa, L.R., Ferreira, A.J. & Palermo-Neto, J. (2012). Acute heat stress impairs performance parameters and induces mild intestinal enteritis in broiler chickens: role of acute HPA axis activation. *Journal of Animal Science*, 90, 1986–1994.

Riddell, C. (1987). *Avian Histophatology*. Lawrence, KS: Allen Press Inc.

Rigby, C.E. & Pettit, J.R. (1980). Changes in the salmonella status of broiler chickens subjected to simulated shipping conditions. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 44, 374–381.

Righi, D.A., Xavier, F.G. & Palermo-Neto, J. (2009). Effects of type II pyrethroid cyhalothrin on rat innate immunity: a flow cytometric study. *International Immunopharmacology*, 9, 148–152.

Saunders, P.R., Kosecka, U., McKay, D.M. & Perdue, M.H. (1994). Acute stressors stimulate ion secretion and increase epithelial permeability in rat intestine. *American Journal of Physiology*, 267, G794–G799.

Sharkey, K.A. & Mawe, G.M. (2002). Neuroimmune and epithelial interactions in intestinal inflammation. *Current Opinion in Pharmacology*, 2, 669–677.

Shini, S., Shini, A. & Huff, G.R. (2009). Effects of chronic and repeated corticosterone administration in rearing chickens on physiology, the onset of lay and egg production of hens. *Physiology & Behavior*, 98, 73–77.

Singleton, K.D. & Wischmeyer, P.E. (2006). Oral glutamine enhances heat shock protein expression and improves survival following hyperthermia. *Shock*, 25, 295–299.

Soderholm, J.D. & Perdue, M.H. (2001). Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280, 7–13.

Star, L., Decuypere, E., Parmentier, H.K. & Kemp, B. (2008a). Effect of single or combined climatic and hygienic stress in four layer lines: 2. Endocrine and oxidative stress responses. *Poultry Science*, 87, 1031–1038.

Star, L., Kemp, B., van den Anker, I. & Parmentier, H.K. (2008b). Effect of single or combined climatic and hygienic stress in four layer lines: 1. Performance. *Poultry Science*, 87, 1022–1030.

Syafwan, S.K., Kwakkel, R.P. & Verstegen, M.W.A. (2011). Heat stress and feeding strategies in meat-type chickens. *World's Poultry Science Journal*, 67, 653–673.

Tachibana, T., Oikawa, D., Takahashi, H., Boswell, T. & Furuse, M. (2007). The anorexic effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone is mediated by corticotrophin-releasing factor in chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 147, 173–178.

Webster Marketon, J.I. & Glaser, R. (2008). Stress hormones and immune function. *Cellular Immunology*, 252, 16–26.

Yalcin, S., Settar, P., Ozkan, S. & Cahaner, A. (1997). Comparative evaluation of three commercial broiler stocks in hot versus temperate climates. *Poultry Science*, 76, 921–929.

Yang, E.V. & Glaser, R. (2002). Stress-induced immunomodulation and the implications for health. *International Immunopharmacology*, 2, 315–324.

Downloaded by [Instituto de Pesquisas e Estudos Florest] at 14:21 12 September 2012