

**Relação entre imunossupressão e
coccidiose clínica em frangos de corte criados
comercialmente**

VERANICE GALHA

São Paulo
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

VERANICE GALHA

**Relação entre imunossupressão e coccidiose
clínica em frangos de corte criados
comercialmente**

Dissertação apresentada para obtenção
do título de Mestre em Imunopatologia
Veterinária pela Universidade Paulista.

Orientadora:
Profa. Dra. Maria Anete Lallo

São Paulo
2006

Veranice, Galha

Relação entre imunossupressão e coccidiose clínica em frangos de corte criados comercialmente : relação entre coccidiose e imunossupressão em frangos de corte / Veranice Galha. – São Paulo, 2006.
69 f.

Dissertação (Mestrado) – Apresentada ao Departamento de Medicina Veterinária Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Paulista , São Paulo, 2006.

Área de Concentração: Imunopatologia Veterinária.

“Orientação: Profª. Drª Maria Anete Lallo. ”

1. Coccidiose. 2. Frangos de corte. 3. Imunossupressão. 4. Reação de hipersensibilidade basofílica cutânea. 5. Fitoemaglutinina. I. Título.

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Eliseo, luz do meu caminho, com especial carinho e gratidão, por ter você sempre ao meu lado

Às minhas filhas Ester e Alice, por vocês existirem e me trazerem, no dia a dia, tanta alegria

Aos meus pais Alcides e Dilza, pela formação que me deram e pelo caráter que em mim talharam

Aos animais, por tudo e por tanto que a eles nós devemos

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente à minha Orientadora Profa. Dra. Maria Anete Lallo, pela competência e segurança, com as quais soube conduzir, passo a passo, este projeto, de tão grande importância para mim. Além de agradecer, quero explicitar minha admiração e apreço pela pessoa e pela mestra.

Agradeço à Profa. Dra. Leoni Villano Bonamim, pela imprescindível colaboração, bem como pela atenção e interesse dedicados.

Agradeço ao Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan, por sua colaboração e atenção.

Agradeço à Profa. Dra. Lúcia Jamili Abel, por tantos esclarecimentos.

Agradeço ao Prof. Dr. Mario Mariano, coordenador do Programa de Mestrado em Medicina Veterinária da UNIP pela oportunidade de realização deste curso de Mestrado.

Agradeço à Profa. Dra. Selene Dall'Acqua Coutinho, igualmente, pela oportunidade da realização do curso de Mestrado, bem como pela obtenção da bolsa de estudos.

Agradeço à Profa. Marcela Santana, pelas informações cedidas.

Agradeço à Profa. Márcia Cristina Menão, pela atenção gentilmente dispensada.

Agradeço ao Prof. Dr. Antônio Pientino Ferreira, do Departamento de Ornitopatologia da USP, pela atenção e informações prestadas.

Agradeço aos simpáticos funcionários da Secretaria de Pós Graduação da UNIP, pela atenção e gentileza que sempre prestaram.

Agradeço a todos os funcionários do Laboratório de Patologia da UNIP, pela pronta colaboração.

Agradeço a todos do Laboratório do Hospital Veterinário da UNIP- Cantareira, pela ajuda prestada.

Agradeço às bibliotecárias, pelo auxílio prestado.

Agradeço aos colegas e amigos de curso, pelo incentivo.

Agradeço à Prosup, pela bolsa de estudos concedida.

Agradeço à Universidade Paulista-UNIP.

Valeu a pena? Tudo vale a pena

Se a alma não é pequena.

Fernando Pessoa

RESUMO

GALHA, V. **Relação entre imunossupressão e coccidiose clínica em frangos de corte criados comercialmente**. 2006, 69 f. Dissertação (Mestrado em Imunopatologia Veterinária) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Paulista (UNIP), São Paulo, 2006.

Frangos de corte criados comercialmente estão expostos a vários fatores que podem comprometer a competência do sistema imune, tornando-os suscetíveis à infecção por coccídias. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a resposta imune celular em frangos acometidos por coccidiose clínica. Para tal, frangos de corte, de ambos os sexos, com 35 a 38 dias de vida foram distribuídos em 3 grupos - grupo I (n=14) - formado por aves sem coccidiose, grupo II (n=16) - formado por aves com coccidiose clínica e grupo III (n=15) - formado por aves sem coccidiose e imunossuprimidas com dexametasona (4mg/kg/dia por 4 dias, via subcutânea). O diagnóstico de coccidiose foi realizado empregando-se a técnica de centrífugo-flutuação com solução saturada de sacarose para investigação de oocistos nas fezes e pelas alterações macroscópicas do intestino observadas na necropsia dos animais. A resposta imune foi avaliada por meio da reação basofílica cutânea (CBH) à fitoemaglutinina na prega interdigital e o índice entre o peso da bursa de Fabrícus e do baço em relação ao peso corporal. Os frangos dos grupos II e III apresentaram menor reação CBH à fitoemaglutinina que os do grupo I, evidenciando diminuição da resposta imune celular. Adicionalmente, as aves do grupo III mostraram diminuição significativa do peso da bursa de Fabricius e do baço em relação aos animais dos outros grupos. As espécies de coccídias encontradas foram *E. acervulina* e *E. maxima* nos animais dos grupos II e III, sendo adicionalmente observada *E. tenella* nas aves tratadas com dexametasona. Conclui-se desta forma que a supressão da resposta imune foi fundamental para a ocorrência de coccidiose em aves.

Palavras-Chave: Coccidiose, frangos de corte, imunossupressão, reação de hipersensibilidade basofílica cutânea, fitoemaglutinina.

ABSTRACT

GALHA, V. Relationship between immunosuppression and clinic coccidiosis in broiler chicks commercially raised. São Paulo, 2006, 69 f. Dissertation (mastership in Veterinary Immunopathology – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Paulista, São Paulo, 2006.

Broiler chicks commercially raised are exposed to a number of factors which may compromise the competence of the immune system, possibly increasing susceptibility to coccidia infection. The purpose of this study was to evaluate the cellular immune response in broilers with clinical coccidiosis. Male and female broiler chickens, from 35 to 38 days- old, were divided into 3 groups – group I (n=14), including chickens without coccidiosis; group II (n=16), including birds with clinical coccidiosis; group III (n=15), constituted by chickens with no coccidiosis and immunosuppressed with dexamethasone (4mg/kg/day for 4 days, subcutaneous route). The diagnosis of coccidiosis was achieved using the centrifugal floatation technique in sucrose solution to investigate the presence of oocysts in stools, as well as by the observation of macroscopic changes in the gut at necropsy. The immune response was evaluated by determination of cutaneous basophil hypersensitivity (CBH) response to phytohemagglutinin (PHA) in the interdigital skin and of the weight ratio of bursa of Fabricius and spleen in relation to the body weight. Broilers from group II and III presented decreased CBH reaction to PHA in relation to group I, suggesting a decrease of the cellular immune response. In addition, chickens from group III presented a significant decrease in the weight of the bursa of Fabricius and of the spleen. The coccidian types were *E. acervulina* and *E. maxima* in chickens from groups II and III, as well as *E. tenella* in chickens treated with dexamethasone. We conclude that the suppression of immune response was fundamental for the occurrence of coccidiosis in chickens.

Key words: Broiler chicks, coccidiosis, cutaneous basophil hypersensitivity test, immunosuppression, phytohemagglutinin.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C = grau centígrado

CBH = hipersensibilidade basofílica cutânea

CD = *cluster* de diferenciação

cm = centímetro

EPI = espessura da prega interdigital

g = grama

GALT = tecido linfóide associado ao intestino

IFN-? = interferon ?

Ig = imunoglobulina

IL = interleucina

kg = quilograma

l = litro

m² = metro quadrado

mg = miligrama

MHC = complexo principal de histocompatibilidade

NK = célula *natural killer*

mm = milímetro

n = conjunto de unidade

NO = óxido nítrico

PC = peso corporal

PHA = fitoemaglutinina

ppm = partes por milhão

Rbaço= razão em porcentagem entre peso do baço e peso corporal

Rbursa= razão em porcentagem entre peso da bursa e peso corporal

TCR = receptor antígeno-específico de célula T

Th = célula T auxiliar

TGF- β = fator de crescimento transformante β

TNF-a = fator de necrose tumoral a

UNIP = Universidade Paulista

μm = micrômetro

© = copyright

® = marca registrada

= = menor ou igual

% = porcentagem

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Presença de petéquias na mucosa duodenal de ave do grupo II. | 51 |
| Figura 2. Jejunó com conteúdo sangüinolento e alimento não-digerido em ave do grupo II, causado por <i>E. máxima</i> . | 51 |
| Figura 3. Cecos distendidos em ave do grupo III infectada por <i>E.tenella</i> . | 51 |
| Figura 4. Ceco de ave do grupo III com conteúdo hemorrágico. | 51 |
| Figura 5. Bursa de Fabricius atrofiada (na parte superior) em aves do grupo III em comparação com as aves do grupo I (na parte inferior). | 52 |
| Figura 6. Baço atrofiado (na parte superior) em aves do grupo III em comparação com aves do grupo I (na parte inferior). | 52 |
| Figura 7. Timo atrofiado (na parte superior) em aves tratadas por dexametasona em comparação com o timo de aves controle s (na parte inferior). | 52 |
| Figura 8. Lobos do timo de ave do grupo I. | 52 |
| Figura 9. Lobos atrofiados do timo de ave do grupo III . | 52 |
| Figura 10. Corte histológico do timo de ave do grupo I, mostrando córtex bem pronunciado e envolvendo a medula. 40x | 53 |
| Figura 11. Corte histológico de timo de ave do grupo II. Observa-se no córtex lesões do tipo “starry-sky” indicando necrose tímica. 40x | 53 |
| Figura 12. Corte histológico de timo de ave do grupo II. Observa-se no córtex lesões do tipo “starry-sky” indicando necrose tímica. 100x | 53 |
| Figura 13. Corte histológico de timo de ave do grupo III, com acentuada atrofia do córtex. 40x | 53 |
| Figura 14. Corte histológico da bursa de Fabricius de ave do grupo I com folículos bem celularizados. 40x | 53 |
| Figura 15. Bursa de ave do grupo III, com folículos retraídos e espaços vazios em seu interior, indicando depleção linfocitária. 40x | 53 |
| Figura 16. Atrofia vilosa com necrose do epitélio da mucosa cecal de animais do grupo III. 40x | 54 |
| Figura 17. Ausência de infiltrado linfo-histiocitário e grande quantidade de formas parasitárias de <i>E. tenella</i> em ceco de ave do grupo III.400x | 54 |
| Figura 18. Formas parasitárias de <i>E. maxima</i> próximas à lâmina própria da mucosa do intestino delgado em ave do grupo II. Nota-se a presença de infiltrado linfo-histiocitário. 100x | 54 |

| | |
|---|----|
| Figura 19. Necrose do epitélio da mucosa em ave do grupo III. Observa-se formas parasitárias de <i>E. tenella</i> . 400x | 54 |
| Figura 20. Nódulo linfóide destacando-se na mucosa do intestino delgado em ave do grupo II. 100x | 54 |
| Figura 21. Presença de oocistos de <i>E. acervulina</i> e <i>E. maxima</i> no intestino delgado de ave do grupo II. 100x | 54 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Tamanho médio dos oocistos de <i>Eimeria</i> , identificados nas aves do grupo II e III. | 47 |
| Tabela 2. Comparação da espessura da prega interdigital pré e pós-inoculação, nos grupos I, II e III. | 48 |
| Tabela 3. Descrição do peso corporal, razão entre peso do baço e peso corporal e razão entre peso da bursa e peso corporal, em porcentagem, nos grupos I, II e III. | 48 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1. Escore de lesões observadas na coccidiose por <i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> e <i>E. tenella</i> . | 41 |
| Quadro 2. Critérios para caracterização histológica da bursa de Fabrícus em aves normais e imunossuprimidas. | 43 |
| Quadro 3. Critérios para caracterização histológica do timo em aves normais e imunossuprimidas. | 43 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 6 |
| 2.1 IMUNIDADE NA COCCIDIOSE | 6 |
| 2.2 IMUNOSSUPRESSÃO | 12 |
| 2.2.1 Nutrição e Imunossupressão | 13 |
| 2.2.2 Micotoxinas | 16 |
| 2.2.3 Vírus | 18 |
| 2.2.4 Estresse | 22 |
| 2.3 TESTE INTERDIGITAL DE FITOEMAGLUTININA PARA AVALIAÇÃO DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE BASOFÍLICA CUTÂNEA EM FRANGOS DE CORTE | 26 |
| 2.4 RAZÃO ENTRE PESO DE ÓRGÃOS LINFÓIDES E PESO CORPORAL COMO PARÂMETRO PARA AVALIAR IMUNOSSUPRESSÃO EM AVES | 28 |
| 2.5 DEXAMETASONA | 31 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 33 |
| 3.1 ALOJAMENTO DAS AVES | 33 |
| 3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL | 35 |
| 3.2.1 Grupos Experimentais | 35 |
| 3.2.2 Pesagem e Identificação das Aves | 37 |
| 3.2.3 Imunossupressão Experimental | 37 |
| 3.3 EXAME PARASITOLÓGICO DE FEZES | 37 |
| 3.3.1 Coleta, Transporte e Conservação das Amostras | 37 |
| 3.3.2 Exame Macroscópico das Amostras | 38 |
| 3.3.3 Exame Microscópico das Amostras | 38 |
| 3.4 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>Eimeria</i> | 38 |
| 3.5 AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE CELULAR PELA RESPOSTA DE HIPERSENSIBILIDADE BASOFÍLICA CUTÂNEA (CBH) À FITOEMAGLUTININA | 39 |

| | |
|--|----|
| 3.6 NECROPSIA E EXAME ANÁTOMO-PATOLÓGICO DOS ÓRGÃOS LINFÓIDES E DO INTESTINO | 39 |
| 3.6.1 Pesagem e Avaliação Macroscópica de Órgãos Linfóides | 40 |
| 3.6.2 Avaliação Macroscópica do Intestino e Escore de Lesões | 40 |
| 3.7 EXAME HISTOPATOLÓGICO DE ÓRGÃOS LINFÓIDES E INTESTINO | 42 |
| 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 44 |
| 4. RESULTADOS | 46 |
| 4.1 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE <i>Eimeria</i> | 46 |
| 4.2 TESTE INTERDIGITAL DE FITOEMAGLUTININA: AVALIAÇÃO DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE BASOFÍLICA CUTÂNEA | 47 |
| 4.3 RAZÃO ENTRE PESO DE ÓRGÃOS LINFÓIDES E PESO CORPÓREO | 48 |
| 4.4 EXAMES HISTOPATOLÓGICOS | 49 |
| 4.4.1 Órgãos linfóides | 49 |
| 4.4.2 Intestino | 49 |
| 5. DISCUSSÃO | 55 |
| 6. CONCLUSÕES | 61 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 62 |

1 INTRODUÇÃO

A coccidiose em aves é uma doença intestinal causada por protozoários de várias espécies do gênero *Eimeria*. Refere-se a uma doença cosmopolita que atinge frangos de corte, galinhas poedeiras e matrizes. Estes parasitas intracelulares multiplicam-se no intestino, causando destruição tecidual e prejudicando a digestão e a absorção dos alimentos, o que resulta em diarreia aquosa e até hemorrágica. Ao mesmo tempo, ocorre o comprometimento da absorção de água, fato que determina desidratação (MCDUGALD, 1997).

O ciclo de vida altamente multiplicativo e a alta resistência dos oocistos possibilitam a fácil disseminação e persistência da doença na avicultura (RUFF, 1999). É uma doença típica de animais jovens, já que, após uma primeira exposição ao agente, a imunidade se desenvolve rapidamente, protegendo a ave contra infecções futuras. Infelizmente, não existe imunidade cruzada entre as espécies de *Eimeria* nas aves e, surtos posteriores podem decorrer por espécies diferentes. Infecção mista, causada por mais de uma espécie de *Eimeria* e acometendo ao mesmo tempo o mesmo hospedeiro, também pode ocorrer. A coccidiose pode ainda facilitar a instalação de outras doenças, pois os tecidos intestinais danificados e as mudanças nas funções do trato intestinal causados por ela podem quebrar as barreiras naturais de defesa e permitir a colonização por vários agentes patogênicos, tais como *Clostridium perfringens* ou *Salmonella typhimurium* (BECKER, 1948 e MACDOUGALD, 1997).

Por sua vez, fatores imunossupressivos podem agir em conjunto com a coccidiose, aumentando a suscetibilidade das aves a outros patógenos e

possibilitando a ocorrência de doenças mais severas. Certos agentes patogênicos e algumas viroses comuns em aves podem afetar de modo negativo a resposta imune contra a coccidiose, resultando em maior duração da infecção e em maior disseminação de oocistos (MACDOUGALD, 1997). A interação de coccídia com outros agentes patogênicos resulta em efeitos patológicos maiores no hospedeiro (RUFF, 1999).

A coccidiose aviária é considerada como uma das mais importantes doenças na indústria avícola, com grandes perdas em escala mundial, que incluem custos com medicação profilática estimados em 1,5 bilhões de dólares ao ano. O grande crescimento da indústria avícola nos últimos 50 anos coincidiu com o desenvolvimento e o uso eficiente de medicamentos coccidiostáticos para inibir ou bloquear as manifestações da doença. Entretanto, a resistência progressiva das coccídias aos fármacos é um fator limitante para o seu controle ou sua eliminação nas granjas comerciais. Desde a introdução da primeira sulfa, no final dos anos quarenta, até o uso atual pela indústria avícola de mais de vinte medicamentos diferentes, a coccidiose tem-se mantido como a mais custosa e a mais comum doença da produção avícola, a despeito dos avanços na quimioterapia, na nutrição, no manejo e na genética (DANFORTH e RUFF, 1999).

Além disto, as vacinas contra a coccidiose aviária produzidas até o momento têm sucesso limitado. Nos frangos de corte, raramente são utilizadas, pois induzem a infecções leves com efeitos sobre o ganho de peso, a conversão alimentar e a pigmentação da pele (MACDOUGALD, 1997).

Devido ao complexo ciclo de vida que o parasita desenvolve dentro do hospedeiro, a resposta imune é também bastante complexa, envolvendo imunidade mediada por células, produção de anticorpos e de citocinas. Embora ocorra produção de anticorpos, estes parecem não serem relevantes na proteção contra a doença, pois aves com agamoglibulinemia ou bursectomizadas, que produzem pouco ou nenhum anticorpo, tornam-se resistentes à reinfecção por coccídias. Evidências crescentes demonstram que a imunidade mediada por células desempenha o papel principal na resistência contra a coccidiose, incluindo tanto a ativação não-específica de linfócitos, macrófagos e células *natural killer* (NK), como a ativação de células T antígeno-específicas. Células T residentes no tecido linfóide associado ao intestino são consideradas os principais efetores da resposta imune primária e secundária e parecem responder tanto por ataque direto às células parasitadas quanto por produção de citocinas (LILLEHOJ, 1999).

Vários são os fatores que podem estar presentes em uma criação comercial de frangos de corte e que, potencialmente, possam interferir com a imunidade, favorecendo a coccidiose. Entre eles destacam-se o estresse, as deficiências de nutrientes, os agentes virais e as micotoxinas, os quais podem determinar estado imunossupressivo nas aves (KAWAZOE, 2000).

A reação de hipersensibilidade basofílica cutânea (CBH) é uma forma de hipersensibilidade tardia mediada por células, na qual mais de 50% das células do infiltrado celular são basófilos. A CBH pode ser induzida pela inoculação intradérmica de mitógenos de células T, como a fitoemaglutinina (PHA) que atua estimulando linfócitos T a produzirem citocinas, as quais, por sua vez, atraem

basófilos para o local da inoculação (STADECKER *et al.*,1977). Os basófilos respondem com a liberação de mediadores químicos inflamatórios que causam contração das células endoteliais e extravasamento de líquido para os espaços intersticiais, além de promoverem vasodilatação (ABBAS, 2003). O teste revela um aumento da espessura da pele da prega interdigital em aves com resposta imune normal, mas, em aves com deficiência imunológica, a reação de hipersensibilidade ao mitógeno é sensivelmente menor (CORRIER e DELOACH, 1990; DIERTET e GOLEMBOSKY, 1994).

Outro parâmetro empregado para investigar a resposta imune das aves é a razão entre o peso da bursa de Fabrícus e do baço, em função do peso corporal, sendo que a diminuição deste índice refere-se a um potencial aumento de imunossupressão (CALNEK *et al.*, 1998; CORRIER *et al.*, 1991; MORGULIS, 1999; POPE, 1991).

O corticosteróide sintético dexametasona é um fármaco causador de forte imunossupressão em aves, tanto da resposta celular quanto humoral. Quando utilizado em aves, provoca uma sensível redução na reação de CBH à fitoemaglutinina, bem como atrofia dos órgãos linfóides. Desta forma, constitui um controle positivo para os estados de imunossupressão (CORRIER e DELOACH, 1990; CORRIER *et al.*, 1991; ISOBE e LILLEHOJ, 1993).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a relação entre a coccidiose clínica em frangos de corte criados comercialmente e imunossupressão, empregando-se para tal o teste de hipersensibilidade basofílica

cutânea a fitoemaglutinina e a relação entre o peso dos órgãos linfóides (bursa e baço) e o peso corporal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMUNIDADE NA COCCIDIOSE

As aves infectadas por coccídias desenvolvem uma sólida imunidade que as protege contra infecções posteriores. A imunidade desenvolvida não previne a invasão das células pelos esquizontes, mas impede o desenvolvimento dos esquizontes em seu interior (LILLEHOJ, 1999).

A principal forma de imunidade envolvida nessa proteção é a celular, realizada principalmente por células T residentes no tecido linfóide associado ao intestino. As citocinas têm uma função importante como reguladora da resposta imune, enquanto a imunidade humoral exerce um papel menos relevante na proteção contra coccídias. Os linfócitos T parecem responder à coccidiose tanto pela produção de citocinas como por ataque citotóxico direto nas células afetadas (ALLEN e FETTERER, 2002).

Outro indicativo da importância das células T na imunidade adquirida contra a coccidiose em aves é o uso, em experimentos, de drogas imunossupressoras como a ciclosporina e a dexametasona, que causam a depleção de células T e da resposta imune celular, sem afetar as células B. A ciclosporina A ministrada antes da inoculação primária de oocistos aumenta a suscetibilidade à coccidiose e, quando ministrada anteriormente a uma infecção secundária, elimina completamente a imunidade protetora. Do mesmo modo, aves tratadas com dexametasona demonstram um aumento na suscetibilidade à

infecção por *Eimeria*, embora o nível de anticorpos específicos contra *Eimeria* aumente (ISOBE e LILLEHOJ, 1993).

O ciclo de vida das coccídias é complexo. Durante cada estágio do ciclo o parasita utiliza nichos diferentes dentro do hospedeiro, desde os espaços extracelulares das mucosas até os meios intracelulares dos enterócitos e outras células do epitélio. Na fase extracelular, o parasita é suscetível a anticorpos, complemento, citocinas, mediadores inflamatórios e à fagocitose. No interior da célula, o parasita é afetado pela atividade citotóxica e por mecanismos intracelulares de defesa, tais como produção de radicais livres e enzimas (ALLEN e FETTERER, 2002).

A resposta imune contra a coccidiose nas aves ocorre nos tecidos linfóides associados ao intestino (GALT). Nas aves, os tecidos linfóides associados ao intestino são extensos e incluem a bursa de Fabricius, as tonsilas cecais, as placas de Peyer e linfócitos agregados ao epitélio e a lâmina própria da parede do trato gastrointestinal (BEFUS *et al.*, 1980).

O GALT tem por reconhecer antígenos e desencadear respostas efetoras. Entre seus constituintes encontram-se as células apresentadoras de antígenos, as imunorreguladoras e as efetoras. Os tecidos efetores da mucosa consistem principalmente em células T, predominantemente células T CD4+ de memória/efetoras, além de um número elevado de células B e plasmócitos, principalmente do isótipo imunoglobulina A (IgA). Células dendríticas e células M são reconhecidas como células apresentadoras de antígeno da mucosa intestinal (BEFUS *et al.*, 1980).

No interior da mucosa gastrintestinal, os linfócitos intestinais estão presentes em dois compartimentos anatômicos: epitélio e lâmina própria. Os linfócitos encontrados no epitélio são denominados linfócitos intra-epiteliais e os encontrados na lâmina própria, separada morfológicamente por uma membrana basal a partir do epitélio, são denominados de linfócitos da lâmina própria. Os leucócitos residentes intestinais dos frangos compreendem 80% de linfócitos, 10 a 15% de monócitos, aproximadamente 5% de células mononucleares e menos de 1% de leucócitos polimorfonucleares e plasmócitos (LILLEHOJ, 1999).

Outro tipo de célula encontrada no epitélio que exerce função efetora citotóxica é a célula NK. O sistema imune associado ao intestino tem como funções gerais processar e apresentar antígenos, produzir anticorpos locais e ativar a imunidade mediada por células (BEFUS *et al.*, 1980; LILLEHOJ, 1999).

A ativação de células B pode ocorrer dentro do intestino, nos linfonodos e no baço. A diferenciação em plasmócitos ocorre dentro dos tecidos linfóides extra-intestinais, de modo que os anticorpos podem ser liberados localmente ou entrar na mucosa via corrente sangüínea. A ação dos anticorpos contra a *Eimeria* inclui opsonização, participação da citotoxicidade por meio da lise por complemento e prevenção da invasão pela imobilização e bloqueio das formas parasitárias extracelulares na superfície do epitélio. Todas estas atividades são dirigidas aos estágios extracelulares. Os anticorpos circulantes, específicos para vários estágios do parasita, são detectáveis dentro de uma semana após a inoculação dos oocistos, alcançando o nível máximo em um ou dois meses e, então, declinando, apesar de persistirem na circulação. Nos frangos, as imunoglobulinas (Ig)

predominantes nas secreções intestinais são as IgA e IgM, capazes de atravessar diretamente a superfície epitelial. Embora a imunoglobulina G possa ser encontrada no intestino, acredita-se que seja derivada da circulação, pois ao atravessar as paredes dos vasos surge nos fluidos intestinais. Este processo é aumentado quando se desenvolve uma reação inflamatória com alterações na permeabilidade nas paredes dos vasos. (KAWAZOE, 2000).

A IgA pode atuar como um anticorpo secretório e possui a capacidade de se associar com uma proteína produzida pelas células epiteliais, o componente secretório. O complexo IgA-componente secretório é interiorizado em vesículas endocíticas, transportado através do citoplasma e exocitado para a superfície externa do epitélio. A principal função da IgA inclui a prevenção da entrada de antígenos ambientais no organismo. Os anticorpos secretórios podem se ligar à superfície dos patógenos e evitar, por bloqueio, a aderência destes ao epitélio. Apesar da ausência de anticorpos, frangos com agamoglobulinemia são resistentes a reinfecção por coccídias (LILLEHOJ, 1999).

A fenotipagem dos linfócitos intestinais dos frangos tem sido realizada utilizando-se anticorpos monoclonais e tais linfócitos parecem exibir marcadores homólogos aos murinos e humanos, como células CD3+, CD4+ e CD8+. O complexo peptídico CD3 é encontrado em associação com o receptor antígeno-específico de células T (TCR), caracterizado pelos heterodímeros $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. As células T auxiliares CD4+ reconhecem antígenos restritos ao complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC-II) e as células T citotóxicas/supressoras CD8+ reconhecem antígenos restritos ao MHC classe I (MHC-I). Nos frangos,

células T com TCR α podem ser tanto CD4+ como CD8+. O papel das diferentes populações de células T na resposta imune contra as coccídias em aves parece ser diferente conforme a espécie de *Eimeria* (ALLEN e FETTERER, 2002).

Células exibindo marcadores para células NK também estão envolvidas na imunidade intestinal. A população destas células aumenta durante a infecção primária por coccídias. As células NK demonstram atividade citotóxica para uma variedade de células alvo. Nos frangos, a atividade das células NK foi demonstrada no baço, no sangue periférico, no timo, na bursa e no intestino. A atividade das células NK aumenta com a idade e seu potencial citotóxico não fica completamente desenvolvido até a ave atingir seis de semanas de vida depois da eclosão. Supõe-se que as células NK são ativas na primeira linha de defesa do hospedeiro por causa da íntima proximidade com o intestino, no qual grande e variada quantidade de substâncias antigênicas é introduzida constantemente. A observação de que os linfócitos intraepiteliais intestinais dos frangos incluem células NK, que medeiam a citotoxicidade espontânea, sugere que as células NK desempenhem um papel importante na defesa local (LILLEHOJ, 1999).

Os macrófagos da mucosa intestinal fagocitam esporozoítos durante a infecção primária e secundária, porém sua atividade não parece aumentada nas aves imunizadas. São fontes de várias citocinas inflamatórias que podem modular a resposta imune celular (ALLEN e FETTERER, 2002).

Estudos recentes indicaram que os linfócitos intra-epiteliais intestinais medeiam a função dos efetores através da secreção de citocinas biologicamente ativas. Em frangos, as informações existentes sobre as citocinas produzidas no

intestino são limitadas. Tem sido descrita a secreção de interferon- γ (IFN- γ), de interleucina-15 (IL-15) e de fator crescimento transformante- β (TGF- β) em galinhas em resposta à coccídeos. O TGF- β talvez possa ter um papel modulador no crescimento das vilosidades intestinais. O IFN- γ , um dos fatores solúveis produzidos por linfócitos ativados, está envolvido na diferenciação, maturação e proliferação de células hematopoiética e aumenta a imunidade não específica contra tumores, assim como também para patógenos microbianos, virais e parasitários. O IFN- γ de galinhas regula a resposta imune do hospedeiro incluindo a ativação de linfócitos e o aumento da expressão do complexo principal de histocompatibilidade classe II contra antígenos. O IFN- γ é uma citocina importante produzida na coccidiose em aves, ativando macrófagos, células T e células NK. Recentemente, identificou-se e relatou-se a presença de IL-15 no intestino de frangos. Embora sua função biológica permaneça desconhecida, um nível alto de expressão nos tecidos intestinais indica seu papel na resposta imune local contra patógenos (LILLEHOJ, 1999).

O fator de necrose tumoral- α (TNF- α) é uma citocina inflamatória secretada por macrófagos ativados. Sua atividade é detectada em aves infectadas. Aves com coccidiose tratadas com TNF- α têm um aumento na perda de peso, enquanto aves tratadas com anticorpos policlonais para TNF- α , reverterem a perda de peso, o que sugere que esta citocina possa ter um importante papel na fisiopatologia da coccidiose. Radicais livres, incluindo, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (NO), são também produzidos por macrófagos ativados e por outros leucócitos fagocíticos. Níveis plasmáticos aumentados de NO podem

ser detectados seis dias após a infecção primária por *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*, mas o aumento do nível não ocorre durante a infecção secundária. Esta observação sugere que a produção de NO pode estar associada à resistência à infecção pela resposta imune inata à coccidiose (ALLEN e FETTERER, 2002).

As respostas imunes intestinais contra coccídias que conduzem a uma imunidade protetora envolvem o inter-relacionamento complexo de fatores solúveis, leucócitos, células epiteliais, células endoteliais e outros fatores fisiológicos dos tecidos linfóides associados ao intestino. As pesquisas sobre a imunidade contra a coccidiose demonstram que as respostas imunes às coccídias são extremamente complexas, envolvendo mecanismos efetores diferentes dependendo do estágio de desenvolvimento do parasita (LILLEHOJ, 1999).

2.2 IMUNOSSUPRESSÃO

A imunossupressão deve ser considerada como um estado de disfunção temporária ou permanente da resposta imune em um dado organismo hospedeiro, sendo resultado de um dano sofrido pelo sistema imune deste. A consequência mais evidente do estado de imunossupressão é o aumento da suscetibilidade a doenças infecciosas e parasitárias. A influência exercida por fatores ambientais e de manejo sobre o funcionamento do sistema imune dos animais pode contribuir para o agravamento do estado de imunossupressão. Vários são os tipos de agentes imunossupressores que afetam aves e mamíferos, destacando-se vírus, toxinas microbianas, estado de deficiência de certos nutrientes e fatores indutores de estresse fisiológico (DOHMS e SAIF, 1984; MONTASSIER, 2000).

2.2.1 Nutrição e Imunossupressão

A nutrição tem o poder de interferir na imunocompetência e, portanto, na resistência às doenças infecciosas. Tanto deficiências severas como crônicas dos nutrientes impedem a resposta imune e aumentam a suscetibilidade a doenças infecciosas, dada a contínua maturação do sistema imune, a alta razão de divisão celular e o grande número de cofatores enzimáticos requeridos para a resposta imune (KLASING, 1977).

As deficiências de certos nutrientes são particularmente deletérias para o sistema imune. Por exemplo, a deficiência de vitamina A reduz a resposta de anticorpos, causa a depleção de linfócitos nos órgãos e tecidos linfóides, diminui o peso do timo e da bursa de Fabricius. Frangos deficientes em vitamina E e selênio têm menor desenvolvimento da bursa, baço e timo. Do ponto de vista prático, muitos nutrientes podem marcadamente modular a resposta imune e a resistência a doenças quando seus níveis na dieta variam para abaixo ou para cima do recomendado. Leucócitos requerem nutrientes, pois durante a resposta imune secretam quantidades de citocinas como as interleucinas (IL) 1 e 6, as quais mobilizam grandes quantidades de nutrientes de outros tecidos, especialmente músculos esqueléticos e ossos. Durante a resposta imune ocorre proliferação clonal de linfócitos, proliferação de leucócitos, produção de anticorpos e citocinas, e na fase de resposta aguda, há grande necessidade de nutrientes para a síntese e liberação de proteínas da fase aguda do fígado, a qual requer muita energia e aminoácidos. Nutrientes potenciais para promover a resposta imune incluem vitamina E, metionina e arginina. A razão entre ácidos graxos ômega-3 e ômega-6

oferecidos na ração determina o tipo de prostraglandinas, tromboxanos e leucotrienos produzidos pelos leucócitos e pelas células acessórias que modulam o sistema imune (KLASING, 1977).

Os efeitos da desnutrição sobre o sistema imune são complexos, incluindo não somente deficiências como também excessos ou desequilíbrios de nutrientes individuais. Em geral, as deficiências nutricionais severas reduzem a função das células T, prejudicando, portanto, a resposta imune mediada por células, induzindo a atrofia tímica e a redução no nível de hormônios tímicos. O número de células T circulantes ou das encontradas nos tecidos linfóides decrescem e as reações de hipersensibilidade tardia são reduzidas. O número de linfócitos B circulantes ou dos encontrados nos tecidos linfóides permanece inalterado e as imunoglobulinas de todas as classes permanecem também normais. A desnutrição severa tem pouco efeito na função das células B. A desnutrição causa redução dos componentes do complemento, prejuízo na quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos e prejuízo na formação de radicais livres de oxigênio e na liberação de enzimas lisossomais (TIZARD, 2002).

O zinco também é um elemento especialmente crítico para o funcionamento do sistema imune. As células epiteliais tímicas secretam timulina, um hormônio peptídico que contém zinco, sendo que este hormônio pode restaurar parcialmente a função das células T em animais timectomizados. O zinco é essencial para o desenvolvimento do timo e das células T, conseqüentemente, animais deficientes em zinco desenvolvem defeitos em suas respostas mediadas por células (PIMENTEL *et al.*; 1991; TIZARD, 2002).

Administrando dietas deficientes em zinco em frangos, CUI *et al.* (2004) demonstraram que a deficiência de zinco inibe seriamente o desenvolvimento dos órgãos linfóides, pois impede a divisão celular dos linfócitos. O órgão mais afetado é a bursa de Fabricius, seguida pelo timo e pelo baço, ocorrendo uma significativa diminuição de peso destes órgãos em relação aos animais controle.

A deficiência de vitamina A pode levar as aves a apresentarem uma maior suscetibilidade a doenças. Se houver deficiência de vitamina A na dieta, células epiteliais se degeneram e diferentes partes do corpo podem ser invadidas por microorganismos e desenvolver infecções (LATSHAW, 1991).

A vitamina E e o selênio afetam a resposta imune e a resistência às doenças. Uma deficiência de vitamina E resulta em imunossupressão e redução da resistência às doenças. Por outro lado, a suplementação das dietas com vitamina E pode levar a um aumento da resistência às doenças. A vitamina E promove a proliferação de células B e o efeito é mais acentuado na resposta imune primária. O modo de ação da vitamina E no aumento da imunidade é obscuro, mas claramente a suplementação de vitamina E deve servir como estímulo significativo da imunidade (TIZARD, 2002).

Os efeitos desse nutriente usualmente estão relacionados com os níveis de selênio. A deficiência conjunta de vitamina E e de selênio diminui significativamente o peso do baço, do timo e da bursa de Fabricius (MARSH *et al.*; 1986).

A deficiência de selênio reduz a atividade neutrofílica, a resposta mitogênica de células T e a produção de IgM. A suplementação com selênio

aumenta a regulação da expressão de receptores de IL- 2 e inibe o dano oxidativo às células imunes. O selênio potencializa a ação da vitamina E (TIZARD, 2002).

A arginina é um aminoácido de especial importância para a resposta imune, pois é reconhecida como substrato para a produção de óxido nítrico, um mediador inflamatório e citotóxico produzido por macrófagos (DIETERT e GOLEMBOSKY, 1994).

Comparando-se frangos que receberam alimentação diariamente com frangos que receberam alimentação em dias alternados, a resposta imune mediada por células, medida por meio da inoculação de fitoemaglutinina na barbeta, mostrou-se significativamente maior tanto nas fêmeas como nos machos, alimentados diariamente, do que naqueles que receberam alimentação em dias alternados (LATSHAW, 1991).

2.2.2 Micotoxinas

Micotoxinas são metabólitos secundários de diferentes tipos de fungos que crescem numa variedade de bolores sobre produtos da alimentação animal e humana. Os sintomas tóxicos causados pela ingestão de moderadas ou altas quantidades de micotoxinas têm sido muito bem investigados em animais domésticos, animais de laboratório e na avicultura, sendo caracterizados por causarem alta mortalidade, baixo crescimento, redução da eficiência reprodutiva e imunossupressão (PIER, 1980).

A imunossupressão causada por micotoxinas pode se manifestar por depressão na atividade de linfócitos T e B, diminuição na produção de anticorpos

e redução na atividade do sistema complemento e da fagocitose. Embora os efeitos imunossupressivos que acompanham as micotoxicoses tenham sido bem demonstrados *in vitro* e *in vivo*, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos não têm sido ainda claramente estudados (CORRIER, 1991).

Micotoxinas afetam o sistema imune e os danos causados a este sistema ocupam posição de destaque, pois expõem o animal a uma infinidade de doenças (SANTIN, 2000).

As aflatoxinas, produzidas principalmente por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Penicilium puberulum*, estão associadas a uma maior suscetibilidade à doenças infecciosas, tais como a coccidiose cecal nas aves (EDDS *et al.*, 1973). As aflatoxinas induzem imunossupressão por causar atrofia da bursa de Fabricius, do timo e do baço (ORTATATLI e OGUZ, 2001), diminuindo ainda a resposta ao teste de hipersensibilidade basofílica cutânea e o título de hemaglutinação a hemácias de carneiro (VERMA *et al.*, 2004). Tem sido demonstrado que a ingestão de aflatoxinas suprime a resposta imune mediada por células, bem como a função efetora celular e a hipersensibilidade tardia mediada por linfócitos T. Além disso, a reação enxerto x hospedeiro sofre supressão em frangos com aflatoxicose (GIAMBRONE *et al.*, 1978).

A resposta mediada por células parece ser afetada com doses baixas da toxina, enquanto que a redução da produção de imunoglobulinas e da resposta por anticorpos ocorre em doses mais altas. O efeito da aflatoxina na resistência do hospedeiro a infecções varia frente à dosagem da toxina, à espécie animal, à idade e à exposição a diferentes patógenos microbianos. O consumo de aflatoxina

tem sido relacionado ao aumento da suscetibilidade à salmonelose, candidíase, doença de Marek e coccidiose em aves (PIER, 1980).

A base molecular e celular e o mecanismo geral responsável pelos efeitos imunossupressivos da aflatoxina parecem estar diretamente relacionados ao impedimento da síntese protéica. A aflatoxina é transformada *in vivo* em metabólitos ativos que se ligam ao DNA e ao RNA, impedindo a transcrição de DNA em RNA e a transcrição do RNA em proteína (HIESH, 1987). Assim a inibição do DNA, do RNA e da síntese protéica, direta ou indiretamente, impede a contínua reprodução e diferenciação das células do sistema linfóide e a síntese de citocinas que regulam a rede de comunicação entre os componentes do sistema imune, bem como a síntese de imunoglobulinas. (CORRIER, 1991).

Várias outras micotoxinas podem acometer a criação de aves. Entre elas, a ocratoxina produzida por *Penicillium viridicatum* e *Aspergillus ochraceus*, que causa atrofia tímica e afeta todos os órgãos linfóides (HOERR, 1997). A ocratoxina também está associada a severas ocorrências de coccidiose em frangos de corte (HUFF e RUFF, 1982).

2.2.3 Vírus

Vários são os vírus que possuem a propriedade de afetar os órgãos linfóides das aves, sendo, portanto, imunossupressores. Entre eles estão os agentes causadores da doença infecciosa da bursa, da anemia infecciosa das aves, das reovirose, da doença de Marek, da leucose linfóide e da retículoendoteliose (MONTASSIER, 2000). Além do mais, a coccidiose é

conhecida por interagir com doenças virais, tendo por resultado um aumento na severidade da infecção por coccídias e/ ou uma interferência no desenvolvimento da imunidade à coccidiose (RUFF e ROSEMBERGER, 1985).

O vírus da anemia infecciosa das aves, por si só ou em combinação com outros agentes, é importante por seu potencial de induzir imunossupressão. As lesões típicas são aplasia de medula óssea, anemia severa, atrofia do timo, da bursa de Fabrícus e do baço, presença de hemorragias na musculatura esquelética e no tecido subcutâneo (OWDADE *et al.*, 2004).

O vírus da anemia infecciosa das aves infecta linhagens linfocíticas e hematopoiéticas da medula óssea e do timo (DAVIDSON *et al.*, 2004). Estudos demonstraram que macrófagos de aves infectadas por este vírus têm uma diminuição na habilidade de produzir IL-1. Como esta citocina tem um papel central na indução da resposta inflamatória, o seu decréscimo resulta numa substancial diminuição da habilidade da ave afetada em apresentar uma resposta imune efetiva. A IL-1 também é requerida para a maturação das células do timo. Qualquer que seja o mecanismo pelo qual o vírus da anemia infecciosa das aves deprima as funções dos macrófagos, a mesma parece predispor o hospedeiro a infecções secundárias (MCCONNEL *et al.*, 1993). É considerado um relevante fator de risco para outras doenças como coccidiose, doenças respiratórias e dermatite gangrenosa (HAGOOD *et al.*, 2000).

Há evidências que a doença de Marek, a leucose linfóide, e a retículoendoteliose exercem efeitos supressivos nas funções imunes do hospedeiro. Os vírus destes três tipos de doença se replicam em células do

sistema linfóide e do sistema retículo-endotelial. Dessa forma, os danos provocados nestas células podem causar imunossupressão (MONTASSIER, 2000; CALNEK, 1997).

A doença de Marek é causada por um herpesvírus com propriedades linfotróficas, podendo ser imunossupressor. A interferência pode resultar diretamente da ação lítica do vírus sobre os linfócitos ou indiretamente por ativar células supressoras, sendo provavelmente ambas importantes. Atrofia bursal e tímica resultam em perda de linfócitos B e T devido à infecção viral. Tanto a imunidade humoral quanto a imunidade mediada por célula podem estar deprimidas, o que é refletido pela diminuição da produção de anticorpos a diversos antígenos e por alterações nas funções de células T, como rejeição a enxertos de pele, estimulação mitogênica de linfócitos, hipersensibilidade tardia e reduzida atividade de células NK (CALNEK *et al.*, 1998). Tal vírus pode aumentar a suscetibilidade à infecção primária e secundária por coccídia (BIGGS *et al.*, 1968).

O vírus da doença infecciosa da bursa causa uma infecção aguda citolítica nos linfócitos B dos frangos, resultando na destruição desta população de linfócitos. O vírus, que tem por alvo os linfócitos B, afeta severamente os tecidos linfóides, principalmente a bursa de Fabricius, onde o repertório de imunoglobulinas é desenvolvido, determinando uma igualmente severa e prolongada imunossupressão (WITHERS *et al.*, 2005). A resposta humoral é fortemente deprimida enquanto a depressão da resposta mediada por células é menos óbvia. O vírus da doença infecciosa da bursa não é completamente específico para células da bursa, pois também destrói células do timo e do baço,

porém estes tecidos se recuperam enquanto a bursa se atrofia (LUKERT e SAIF, 1997). Aves imunossuprimidas pelo vírus da doença infecciosa da bursa, além da capacidade imune reduzida, tornam-se mais suscetíveis a infecções por coccidiose (SIMON e ISHIKUSA, 2000).

Algumas cepas de reovírus isoladas demonstraram, experimentalmente, serem imunossupressivas, causando massiva depleção de linfócitos e provocando atrofia bursal (SHARMA e ROSEMBERGER, 1987).

Reovirose e coccidiose são comumente encontradas na avicultura e uma das mais óbvias interações entre coccidia e reovírus é o marcado aumento da inflamação das articulações das patas. Esta interação também pode conduzir a um aumento dos efeitos patológicos da infecção, afetando dramaticamente os parâmetros econômicos da produção, como ganho de peso, e causando despigmentação e fraqueza nas pernas (RUFF e ROSEMBERGER, 1985).

Inoculando cepa virulenta por via oral, NI e KEMP (1995) constataram que as lesões mais severas na bursa surgiram no segundo dia pós-inoculação, com infiltrado de heterófilos e linfócitos e diminuição do número dos linfócitos dentro dos folículos. A presença do vírus na medula óssea, na bursa e no baço, bem como as lesões na medula óssea, sugerem um efeito imunossupressivo do reovírus nas aves infectadas.

Em aves doenças conhecidas como leucoses são causadas por vírus da família *Retroviridae*. A leucose linfóide é a mais comum destas leucoses. O vírus da leucose linfóide provoca tumores linfóides de tamanho e número variáveis

numa grande variedade de órgãos e quase sempre envolvem fígado, baço e bursa de Fabrícus (SMITH e VAN ELDIK, 1978).

As doenças designadas por reticuloenditelioses também são causadas por retrovírus. Elas se manifestam pela forma neoplásica, na qual células do sistema retículo-endotelial são as mais proeminentes nas lesões, ou pela forma de síndrome da doença do atraso do desenvolvimento, na qual ocorre atrofia do timo e da bursa de Fabrícus e as respostas imunes celular e humoral encontram-se deprimidas (SCOFIELD e BOSE, 1978; WITTER, 1997).

2.2.4 Estresse

O estresse é causa de imunossupressão em aves, podendo causar aumento da suscetibilidade a doenças infecciosas. Em aves criadas comercialmente, o estresse pode ser induzido por diversos fatores, sejam eles infecciosos ou ligados ao manejo. Dentre os agentes indutores de estresse, destacam-se temperatura ambiente, ventilação, qualidade do ar, densidade populacional, competição por alimento e água de beber, nível de ruído no ambiente e fotoperíodo em que as aves são submetidas (DIETERT e GOLEMBOSKI, 1994).

A modulação induzida pelo estresse no sistema imune das aves é um tópico de importância econômica, social e científica. Na pecuária, é amplamente aceito que o impacto econômico negativo das doenças é maior em animais estressados (DOHMS e MERTZ, 1991).

Claude Bernard (1813-1878) descreveu o meio interior dos animais caracterizado por uma constância e um balanço. Cannon (1871-1945) reconheceu este balanço interno no moderno contexto da fisiologia e o denominou de homeostase. Ele também implicou o sistema nervoso autônomo no estresse e descreveu a reação de luta – fuga. Hans Selye (1907-1982) propôs a síndrome de adaptação geral, a primeira teoria biológica compreensível do estresse. Mais recentemente, o estresse foi definido como um estado de ameaça ao balanço ou equilíbrio. As forças que causam distúrbios na homeostase são chamadas estressoras e as forças contrárias que tentam restabelecer a homeostase são chamadas de respostas adaptativas (CHROUSOS *et al.*, 1988). Qualquer que seja a definição, todas têm em comum as respostas adaptativas frente aos desafios à homeostase. Estas reações adaptativas podem mobilizar variadas respostas fisiológicas, incluindo respostas imunes (DOHMS e MERTZ, 1991).

Estudando a síndrome de adaptação geral, Hans Selye descreveu uma via comum, não-específica de resposta, ao perceber que um estressor dispara uma reação de alarme em um animal ou uma reação de ataque-fuga, causada pela liberação de catecolaminas, o que resulta num aumento das funções cardiovasculares e metabólicas. Se o estímulo estressor persistir por uma fase de resistência, inicia-se um aumento das reações fisiológicas objetivando manter a homeostase. Se o estresse crônico continuar persistindo, uma fase de exaustão se instala, podendo levar ao aparecimento de doenças. A via da resposta adaptativa comum da teoria de Selye se dá por meio do eixo hipotálamo- hipófise- adrenal. Esta via envolve a percepção de estressores pelo cérebro e a liberação pelo

hipotálamo do fator de liberação de corticotrofina, o qual estimula a hipófise anterior a secretar hormônio adrenocorticotrófico. Este cai na circulação e estimula a adrenal a secretar glicocorticóides, os quais provocam gliconeogênese, hiperglicemia e diminuem as respostas imune e inflamatória (DOHMS e MERTZ, 1991).

Estudos recentes sugerem que há quatro diferentes vias de resposta neuroendócrina no estresse o sistema nervoso autônomo; o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal; via extra-adrenal envolvendo neuropeptídios e neurotransmissores e mediadores neuroimunológicos (GRIFFIN, 1989).

Os nervos simpáticos e o sistema nervoso autônomo inervam tecidos linfóides. Estes nervos liberam catecolaminas na reação de ataque-fuga, sugerindo uma regulação rápida e direta do sistema nervoso simpático sobre a resposta dos tecidos linfóides (DOHMS e MERTZ, 1991).

A liberação de neuropeptídios e de neurotransmissores, tais como, serotonina, insulina, substância P, peptídeo intestinal vasoativo, vasopressina, ocitocina, hormônio do crescimento, endorfinas, encefalinas e acetilcolina de tecido nervoso durante o estresse envolveria um papel imunomodulador dos sistemas nervoso e linfóide. Receptores para estes compostos são encontrados em linfócitos e a aplicação exógena dos mesmos altera a resposta imune (GRIFFIN, 1989).

No estresse, ocorre uma resposta integrada e bidirecional por atividade dos sistemas nervoso e imune. Ambos os sistemas reconhecem estímulos que ameaçam a homeostase e iniciam uma resposta adaptativa integrada. O sistema

nervoso pode regular o sistema imune. Células mononucleares possuem receptores para neurotransmissores e neuropeptídeos e tecidos linfóides primários e secundários recebem inervação simpática. Por outro lado, células linfóides ativadas podem modular a atividade do sistema nervoso central pela liberação de citocinas (*BASEDOVSKY et al.*, 1977).

A corticosterona é o principal hormônio liberado pela glândula adrenal das aves e se mostra aumentada nas situações de estresse. Em um estudo realizado em galinhas poedeiras, uma situação de estresse crônico foi induzida por administração de corticosterona na alimentação, com o objetivo de determinar as respostas imunes humoral e celular. Este modelo demonstrou profundo impacto sobre ambas as respostas imunes, diminuindo a reação de hipersensibilidade tardia, a reação de hipersensibilidade basofílica cutânea, a resposta humoral ao toxóide tetânico e a antígenos de hemácias de carneiro e a resposta de proliferação à fitoemaglutinina (*EL-LECTHEY et al.*, 2003).

Quando frangos são expostos a estresse moderado, os níveis de corticosterona aumentam por um curto período de tempo, enquanto a atividade de células NK decai. No entanto, assim que os níveis de corticosterona retornam ao normal, os níveis de atividade das células NK não se restabelecem aos níveis iniciais. Estes dados indicam que, em frangos de corte, o estresse moderado causa severos danos à atividade das células NK (*KUSHIMA et al.*, 2003).

2.3 TESTE INTERDIGITAL DE FITOEMAGLUTININA PARA AVALIAÇÃO DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE BASOFÍLICA CUTÂNEA EM FRANGOS DE CORTE

O teste de resposta de hipersensibilidade basofílica (CBH) cutânea provocado pela fitoemaglutinina é utilizado para avaliar a imunidade celular *in vivo* em frangos. A CBH é uma forma de hipersensibilidade tardia mediada por células na qual leucócitos basofílicos podem corresponder a mais de 50% do infiltrado celular. A CBH pode ser induzida por inoculação de antígeno em adjuvante incompleto de Freund, sendo testada sete dias mais tarde por inoculação do antígeno específico na pele, bem como pode ser obtida por inoculação de doses apropriadas de mitógenos de células T na pele de cobaias normais. A CBH pode ser abolida ou marcadamente suprimida em animais tratados com anticorpos anti-células T, sugerindo que os linfócitos T são os elementos essenciais para sua ocorrência. Nas espécies que não apresentam basófilos circulantes, como ratos e camundongos, não é possível se promover a reação de CBH com mitógenos de células T (STARDECKER *et al.*, 1977).

A função da CBH permaneceu um mistério até que foi demonstrado que cobaias picadas por certos carrapatos apresentaram reações de CBH graves no local da ligação do carrapato. A infiltração dos basófilos e a secreção de materiais farmacologicamente ativos a partir de seus grânulos resultaram na morte do carrapato e sua conseqüente separação da pele. Desta forma, a CBH pode ter um importante papel na imunidade contra parasitas (BENJAMINI *et al.*, 2002).

No frango, o mecanismo de infiltração basofílica provocado pela fitoemaglutinina parece ser o mesmo que o postulado para a cobaia, isto é, a fitoemaglutinina (PHA) estimula os linfócitos T da área inoculada a produzirem uma substância atraente para os basófilos (STARDECKER *et al.*, 1977). Em frangos timentomizados ocorre a supressão da reação de CBH por PHA, o que sugere um mecanismo T dependente para a CBH (GOTO *et al.*, 1978).

É possível que mastócitos, os quais apresentam grânulos metacrômicos em seu citoplasma, assim como os basófilos, também possam participar deste processo, exercendo funções similares ou suplementares. Nas aves, embora mastócitos e basófilos sejam células distintas, geralmente não são distinguidas nos dados de literatura, identificando-as apenas como células metacrômicas (STARDECKER *et al.*, 1977).

Os basófilos respondem a citocinas produzidas por linfócitos T, com liberação de mediadores inflamatórios e vasoativos, entre eles, a histamina no homem e a serotonina nos roedores. A histamina liga-se a receptores celulares de várias células, causando diferentes efeitos. No endotélio, causa vasodilatação das células endoteliais e extravasamento de líquidos para os tecidos (ABBAS, 2003). Nas aves, basófilos são células encontradas em número significativo no início do processo inflamatório, apresentando degranulação e, possivelmente, causando liberação de histamina e serotonina (KATIYAR *et al.*, 1992).

Segundo CORRIER e DELOACH (1990), a resposta CBH promovida pela inoculação cutânea interdigital de PHA é detectada por um aumento na espessura da pele no local da inoculação, o que pode ser observado seis horas após

atingindo o máximo efeito 12 horas pós-inoculação e permanecendo constante ou começando a declinar após 24 horas da inoculação.

A CBH no frango, provocada por inoculação intradérmica de PHA é um teste de eleição para respostas timo-dependentes mediadas por células T. O teste cutâneo interdigital em frangos é usado como um modo simples de avaliar *in vivo* sua imunocompetência. O teste interdigital possibilita ainda a avaliação em animais jovens com menos de três semanas de vida, nos quais a barbela, outro local onde o teste cutâneo pode ser aplicado, ainda não se encontra desenvolvida. Este teste avalia a responsividade de células T *in vivo* em frangos jovens e detecta a atividade deficiente de células T em frangos imunossuprimidos (CORRIER e DELOACH, 1990). Segundo DIERTET e GOLEMBOSKI (1994), o teste de CBH é um meio de se obter acesso à resposta imune T-dependente possível de se realizar em plantéis de aves a campo.

2.4 RAZÃO ENTRE O PESO DE ÓRGÃOS LINFÓIDES E O PESO CORPORAL COMO PARÂMETRO PARA AVALIAR IMUNOSSUPRESSÃO EM AVES

Um indicativo anatômico de imunossupressão é a marcada redução de linfócitos, tanto em órgãos linfóides primários como em secundários. A redução de linfócitos nestes órgãos representa uma potencial disfunção da resposta imune. Nas aves, é comum tomar por medida a razão entre o peso da bursa e o peso corpóreo, de forma que o decréscimo da mesma representa um indício provável de aumento da imunossupressão (POPE, 1991).

CORRIER *et al.* (1991) induziram imunossupressão por aplicação de ciclofosfamida, ciclosporina ou dexametasona em aves de um a quatro dias de idade, obtendo significativa diminuição do peso da bursa ao 10º dia no grupo dos animais tratados quando comparado ao grupo controle.

A bursa de Fabricius é um órgão linfóide exclusivo das aves. Animais bursectomizados produzem poucos anticorpos, não apresentam plasmócitos, embora apresentem linfócitos circulantes e sejam capazes de rejeitar transplantes. Este último item denota que a bursectomia possui pouco efeito sobre a resposta imune mediada por células. Aves bursectomizadas são mais sensíveis à *Leptospira* e à *Salmonella*, mas não a bactérias, contra as quais a imunidade celular é importante, como o *Mycobacterium avium*. Estes dados sugerem que a bursa é um órgão linfóide primário no qual ocorre a maturação e a diferenciação de células produtoras de anticorpos, células estas chamadas então de linfócitos B. Além de ser um órgão linfóide primário, a bursa também é considerada um órgão linfóide secundário, uma vez que nela ocorrem captura de antígenos e síntese de anticorpos. Linfócitos T também são encontrados na bursa, em uma pequena área localizada na porção dorsal deste órgão (TIZARD, 2002).

A atrofia da bursa e do timo são decorrentes de depleção linfocítica nestes órgãos (NAKAMURA *et al.*, 1986), podendo ser provocada por diversas causas, tais como doenças nutricionais, uso de esteróides, toxinas, micotoxinas e infecções virais, incluindo a doença infecciosa da bursa, a doença de Marek, a anemia infecciosa das aves e certas cepas de reovírus (CALNEK *et al.*, 1998; GORYO *et al.*, 1989; SHARMA *et al.*, 1994). É importante salientar que várias

causas de atrofia bursal podem estar associadas na avicultura comercial (POPE, 1991).

CHO e EDGARD (1972), avaliando a doença infecciosa da bursa em frangos infectados experimentalmente, determinaram o efeito imunossupressivo desta infecção no peso da bursa e observaram que, em média, o peso da bursa dos frangos infectados começava a aumentar 24 horas pós-inoculação, atingindo o máximo de peso a 48 horas, voltando ao normal após 72 horas, mas diminuindo significativamente em 96, 120 e 144 horas pós-inoculação. O aumento do peso da bursa em relação ao peso corporal após 48 horas, quando comparado ao grupo controle de frangos não-infectados, aumentou significativamente. Às 96 horas, o decréscimo do peso da bursa foi significante e às 120 e às 144 horas o decréscimo do peso foi altamente significante.

O sucesso da avicultura intensiva relaciona-se a uma imunidade adequada. A redução da resposta imune conduz a um aumento da suscetibilidade às doenças e a sérios prejuízos. Ressaltando que a imunossupressão é decorrente de uma injúria ao sistema imune causada por um agente imunossupressivo, DOHMS e SAIF (1984) sugeriram avaliar outros danos causados ao sistema imune como forma de verificação da imunossupressão. Sugeriram, assim, investigar mudanças morfométricas nos tecidos linfóides primários e secundários, bem como quantificar mudanças no peso das estruturas linfóides ou mudanças na composição celular dos tecidos responsáveis pelo desenvolvimento linfóide ou pela atividade de resposta imune.

2.5 DEXAMETASONA

Os corticosteróides são potentes agentes antiinflamatórios. Como estes fármacos são derivados farmacológicos dos hormônios esteróides da família dos glicocorticóides, eles exercem seus efeitos fisiológicos através da sua ligação a receptores intracelulares específicos, expressos em quase todas as células do corpo. A ação imunossupressora dos corticosteróides se deve a vários efeitos que, em sua maioria, são uma consequência da regulação da transcrição gênica por indução de corticosteróides. Os corticosteróides diminuem a expressão de vários genes que codificam citocinas inflamatórias, tais como IL-1, IL-2, TNF- α , entre outras. Os corticosteróides também inibem a expressão de moléculas de adesão, prejudicando a migração de linfócitos para o local da inflamação e, portanto, inibindo a atividade das células inflamatórias. Além disto, eles estimulam a liberação de endonucleases celulares, levando à apoptose de linfócitos e eosinófilos. Os corticosteróides também reduzem a fagocitose e a morte promovidas por neutrófilos e macrófagos, bem como a expressão de moléculas classe II do MHC. Desta maneira, tais drogas acabam inibindo a ativação e função das células T (BENJAMINI *et al.*, 2002).

Nos frangos, o tratamento com glicocorticóides provoca diminuição do ganho de peso, atrofia do baço, do timo e da bursa de Fabricius e diminuição da resposta a anticorpos de eritrócitos de carneiro (GROSS *et al.*, 1979). O tratamento prolongado com dexametasona em frangos aumenta a suscetibilidade à *Eimeria spp.*, determinando maior produção de oocistos, prolongamento do

período pré-patente e diminuição no número de linfócitos intestinais (LONG e ROSE, 1970).

Em células de baço de frangos tratados com dexametasona, esta produz uma significativa supressão na indução de linfoproliferação por concavalina A e o tal efeito supressivo na resposta mitogênica aumenta com a duração do tratamento. Aves tratadas com 0,5 mg de dexametasona diariamente por 9-12 dias mostram um significativo decréscimo da produção IL-2 e IFN- γ por células esplênicas estimuladas por concavalina A. O número de células NK também mostra-se diminuído nos animais tratados (ISOBE e LILLEHOJ, 1992).

Frangos tratados com dexametasona apresentam diminuição da CBH induzida pela fitoemaglutinina, sendo esta significativamente menor do que em aves não-tratadas, o que indica que a dexametasona causa depressão da imunidade mediada por células. Sendo a CBH timo-dependente, o teste intradérmico de fitoemaglutinina é utilizado para avaliar a resposta imune celular em aves (CORRIER e DELOACH, 1990).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ALOJAMENTO DAS AVES

A presente investigação foi realizada na Granja Santana localizada no Município de Tietê, Estado de São Paulo, com aves de ambos os sexos, da espécie *Gallus gallus* da linhagem comercial Hybro de frangos de corte.

Os galpões nos quais as aves foram mantidas eram de alvenaria, construídos no sentido leste-oeste, cobertos com telha de amianto e com piso de concreto. As laterais dos galpões eram fechadas com telas de arame e recobertas com cortinas plásticas de abertura manual. Todos eram equipados com comedouros automáticos, bebedouros tipo nipple, ventiladores e nebulizadores de controle automático.

Antes do alojamento das aves, os galpões foram desinfetados com solução de amônia quaternária e glutaraldeído por meio de nebulização. Sobre o piso dos galpões utilizou-se para revestimento uma camada de 10 cm de pó de pinus.

Pintinhos de um dia de vida foram alojados nestes galpões, respeitando a densidade 13 aves por m². Durante os primeiros dez dias de vida, os pintinhos foram aquecidos através ar quente proveniente de uma fornalha a lenha, localizada na parte externa de cada galpão e que mantinha uma temperatura ambiente interna na faixa de 28 a 32° C.

As aves receberam ração para frango de corte, a base de milho e soja, suplementada com complexos vitamínicos, minerais e aminoácidos, fornecida “*ad libitum*”.

Em cada fase da criação, a ração sofreu modificações em sua concentração de proteínas, sendo que, do 1º ao 7º dia a ração apresentava 22% de proteína bruta, do 8º ao 21º dia apresentava 20% de proteína bruta, do 22º ao 37º dia apresentava 18% de proteína bruta e, por fim, do 38º dia até o abate apresentava 16% de proteína bruta.

Toda a água fornecida para a criação, tanto a de beber como a para a nebulização, era proveniente de um reservatório metálico com capacidade de 20.000 l, preenchido continuamente com água oriunda de poço artesiano. Após o programa de vacinação, isto é, do 16º dia de vida das aves até o abate, foi realizada a cloração da água do reservatório com tricloro, de modo a conferir 0.3 a 0.5 ppm de cloro no nipple.

O programa de imunização das aves iniciou-se no incubatório, logo após o nascimento, onde os pintinhos receberam vacina contra bronquite infecciosa das aves e contra a doença de Marek. Depois de alojados na granja, no 7º dia de vida receberam a primeira dose de imunização contra a doença infecciosa da bursa com a vacina Univax ® Plux (Shering-Plough Coopers) e, no 14º dia, a segunda dose para a mesma doença com a vacina Avimmune® - F (Shering-Plough Coopers). Ambas as vacinas foram ministradas através da água de beber.

Para o controle da coccidiose, foi fornecida por meio da ração, desde o 1º ao 21º dia de vida, o coccidiostático químico Nicarbazina® (Roche) na dosagem

de 100 mg/ kg de ração. Para complementar o programa de controle a partir do 22º dia, a Nicarbazina foi suspensa e do 22º ao 38º dia de vida, o ionóforo a base de salinomicina de nome comercial Coxistac® (Phibro) foi introduzido na dosagem de 66 mg/kg de ração. Do 39º dia de vida até o abate, toda a medicação foi suspensa.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 Grupos Experimentais

Foram formados três grupos com aves de ambos os sexos, na quinta semana de idade. Todas as aves foram submetidas às mesmas condições de manejo. Os grupos foram constituídos da seguinte maneira: grupo I, formado por aves sem coccidiose clínica (grupo controle); grupo II, formado por aves com coccidiose clínica e não submetidos à imunossupressão (grupo coccidiose); e grupo III, formado por aves sem coccidiose clínica e submetidas à imunossupressão por dexametasona (grupo imunossuprimido). Os grupos foram constituídos concomitantemente e a duração do experimento foi de 7 dias.

Cerca de 40 aves de 31 dias de vida, de ambos os sexos, provenientes de um determinado galpão e não apresentando qualquer anormalidade quanto ao seu estado de saúde, foram separadas e alojadas individualmente em contêineres de polipropileno de 200 litros, por um período de 6 horas para observação prévia. As aves que apresentaram fezes de aparência normal tiveram suas amostras fecais examinadas para encontro de oocistos de coccídias. Das aves com

resultado parasitológico negativo e sem sinais clínicos de coccidiose, foram selecionadas 14 aves para a constituição do grupo I (controle) e 15 aves para a constituição do grupo III (imunossuprimido por dexametasona).

Ao surgimento de um surto de coccidiose em condições naturais, em um outro galpão, cerca de 20 aves com 35 dias de vida, de ambos os sexos e apresentando sinais clínicos da doença, foram submetidas ao mesmo procedimento de observação prévia. Os animais que apresentaram alterações em suas fezes quanto à consistência, coloração e presença de catarro e/ou sangue tiveram amostras fecais submetidas a exame parasitológico. Dezesesseis aves que apresentaram oocistos de coccídios em suas fezes foram separadas para o experimento, constituindo o grupo II com coccidiose clínica.

Uma vez constituídos os três grupos, as aves foram retiradas dos contêineres, reunidas por grupo e alojadas em 3 boxes de 2 m² cada, construídos com paredes de madeira compensada de 60 cm de altura, montados respectivamente dentro do mesmo galpão do qual cada grupo de aves havia sido proveniente, ficando, portanto, sob as mesmas condições ambientais e de manejo que os outros animais dos galpões. Nestes boxes, as aves do grupo I permaneceram ainda em observação por mais 4 dias e as aves do grupo III foram submetidas à imunossupressão por dexametasona.

3.2.2 Pesagem e Identificação das Aves

Imediatamente antes do início do experimento, todas as aves, de todos os grupos, foram devidamente pesadas e identificadas, por meio de numeração realizada com caneta hidrográfica, sobre a pele da pata de cada ave.

3.2.3 Imunossupressão Experimental

As aves deste grupo III foram inoculadas, por via subcutânea, com 4 mg/kg de dexametasona (Azium®, Shering Corp.), aplicada por 4 dias consecutivos antes do início do experimento.

3.3 EXAME PARASITOLÓGICO DE FEZES

3.3.1 Coleta, Transporte e Conservação das Amostras

As amostras de fezes de todas as aves selecionadas para o experimento foram colhidas em frascos plásticos, identificadas e conservadas em dicromato de potássio a 2%. O processamento dos espécimes fecais foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias do Hospital Veterinário da Universidade Paulista (UNIP). As amostras foram mantidas sob refrigeração e processadas num período máximo de 24 horas.

3.3.2 Exame Macroscópico das Amostras

As amostras de fezes foram analisadas quanto ao seu aspecto visual macroscópico e quanto a alterações na consistência, coloração e presença de catarro e/ou sangue (BECKER, 1948; MACDOUGALD, 1997)

3.3.3 Exame Microscópico das Amostras

A análise microscópica foi feita pela técnica de centrífugo-flutuação em solução de sacarose (densidade $1,2 \text{ g/cm}^3$) (OGASSAWARA *et al.*,1989). O sobrenadante foi coletado com alça bacteriológica (4 mm de diâmetro) e colocado entre lâmina e lamínula, sendo observado em microscópio de luz com aumento de 40, 100 e 400 vezes.

3.4 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Eimeria*

Para a identificação dos oocistos das diferentes espécies de *Eimeria*, foram realizadas as mensurações em microscópio óptico, no aumento de 400 vezes, por meio de ocular micrométrica. Foram mensurados 30 oocistos de cada tipo morfológico de *Eimeria* e obtidas as médias dos seus comprimentos e de suas larguras em μm . As medidas obtidas foram comparadas às compiladas de várias fontes por MACDOUGALD (1997), tomadas como padrão. Para confirmação das espécies de *Eimeria*, associou-se ainda a observação do tipo e o local das lesões macroscópicas encontradas no intestino durante a necropsia (JOHNSON e REID, 1970).

3.5 AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE CELULAR PELA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE BASOFÍLICA CUTÂNEA (CBH) À FITOEMAGLUTININA

Para a avaliação da resposta basofílica cutânea (CBH) à fitoemaglutinina (Laboratório Cultilab), cada animal teve tomada a espessura da prega interdigital entre o 3º e 4º dígitos da pata direita, imediatamente antes da aplicação de 0,1 ml de fitoemaglutinina e entre o 3º e 4º dígitos da pata esquerda, imediatamente antes da aplicação de 0,1 ml de solução salina a 0,9%. Utilizou-se para a tomada das espessuras das pregas cutâneas (em mm) um micrômetro digital (Mitutoyo Ltda).

Após 12 horas da aplicação, a medida da prega foi tomada novamente em cada pata e o resultado foi obtido pela diferença entre a espessura da prega após 12 horas da inoculação (T12) e a espessura da prega imediatamente antes da inoculação (T0) em milímetros.

3.6 NECROPSIA E EXAME ANATOMOPATOLÓGICO DOS ÓRGÃOS LINFÓIDES E DO INTESTINO

Todos os animais foram submetidos a eutanásia por deslocamento cervical e submetidos à necropsia para avaliação macroscópica dos órgãos imunes e do intestino. Amostras dos órgãos foram coletadas, identificadas e conservadas em formol a 10% para serem processadas para exame histopatológico.

3.6.1 Pesagem e Avaliação Macroscópica de Órgãos Linfóides

De cada ave, o timo, o baço e a bursa de Fabricius foram observados quanto ao seu aspecto, tamanho, cor e outras possíveis alterações. O baço e a bursa foram coletados e pesados individualmente.

3.6.2 Avaliação Macroscópica do Intestino e Escore de Lesões

O intestino foi examinado para identificação de lesões macroscópicas, sendo adotada a técnica preconizada por JOHNSON e REID (1970) como descrito a seguir. Para a investigação, o órgão é retirado e dividido em 4 partes: duodeno; jejuno até a altura do divertículo de Meckel; íleo, reto e tonsilas cecais; e os dois cecos. A superfície da serosa foi examinada para petéquias, placas e outros sinais de lesões por toda a extensão do intestino. A superfície da mucosa e o conteúdo intestinal foram observados e foi investigada a presença de lesões superficiais ou mais profundas. Foi estabelecida a avaliação para o escore de lesões para as espécies de *Eimeria* encontradas parasitando o órgão (Quadro 1).

Quadro 1. Escore de lesões observadas na coccidiose por *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*

| Escore de lesões | <i>E. acervulina</i> | <i>E. maxima</i> | <i>E. tenella</i> |
|-------------------------|--|---|---|
| 0 | Ausência | Ausência | Ausência |
| +1 | Placas esbranquiçadas orientadas transversalmente na parede do duodeno, num máximo de 5 por cm ² | Pequenas petéquias na serosa e mucosa do intestino médio, parede intestinal sem espessamento ou distensão, presença ou não de secreção alaranjada | Poucas petéquias na parede do ceco, sem apresentar espessamento das paredes do mesmo, conteúdo cecal normal |
| +2 | Placas mais próximas, porém não coalescentes, podendo se estender 20cm abaixo do duodeno, parede intestinal mais espessada, conteúdo intestinal normal | Várias petéquias na mucosa, conteúdo mucoso alaranjado pode estar presente, paredes espessadas, podendo ou não apresentar pouca distensão | Lesões mais numerosas na mucosa, notável presença de sangue no conteúdo cecal, paredes ligeiramente espessadas, presença de conteúdo cecal normal |
| +3 | Placas numerosas e coalescentes, conteúdo aquoso, parede intestinal espessadas, lesões se estendem até o divertículo de Meckel | Mucosa enrugada, conteúdo intestinal com pontos hemorrágicos e muco, paredes espessadas e distendidas | Grande quantidade de sangue presente no ceco. Paredes do mesmo bem espessadas, pouco ou nenhum conteúdo cecal normal |
| +4 | Placas totalmente coalescentes, mucosa acinzentada, petéquias podem ocorrer, parede do intestino bem espessadas, conteúdo intestinal cremoso | Mucosa com numerosos pontos hemorrágicos e sangue, odor pútrido, parede intestinal bastante distendida, podendo se distender por toda a extensão do intestino | Presença de sangue e cores caseosas, sem conteúdo cecal normal parede cecal distendida |

Fonte: JOHNSON e REID (1970)

3.7 EXAME HISTOPATOLÓGICO DE ÓRGÃOS LINFÓIDES E DO INTESTINO

Depois de permanecer por até 72 h na solução fixadora de formol a 10%, fragmentos do timo, do baço, da bursa de Fabricius e dos intestinos foram desidratados, diafanizados e incluídos em parafina. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina e as preparações foram observadas em microscópio óptico com os aumentos de 40, 100 e 400 vezes. O preparo dos cortes histológicos foi realizado no Laboratório de Anatomia Patológica-Apoio à Pesquisa e Pós- Graduação da UNIP.

Para a avaliação histopatológica qualitativa da bursa, foram adotados os critérios utilizados por NAKAMURA, (1986), POPE (1991) e RACHID (2002) (Quadro 2). De acordo com estes autores, frangos de corte jovens sadios apresentam folículos linfóides bem celularizados, totalmente preenchidos por linfócitos, com definição clara das regiões cortical e medular, estroma interfolicular escasso e delgado, pregas bursais revestidas por epitélio simples colunar, bem distendido e com poucas células calciformes. Frangos imunossuprimidos apresentam folículos linfóides diminuídos de tamanho, com menor celularidade e rarefação difusa de linfócitos tanto na região cortical como na medular, caracterizando atrofia folicular, com formação de espaços vazios no seu interior, o estroma de sustentação torna-se mais evidente e mais frouxo, o tecido conjuntivo interfolicular mostra-se espessado, o epitélio de revestimento torna-se irregular,

adquirindo aspecto papilífero e sugerindo retração das pregas, com aumento de células caliciformes.

Quadro 2. Critérios de caracterização histológica da bursa de Fabricius em aves normais e imunossuprimidas.

| Critérios | Aves normais | Aves imunossuprimidas |
|----------------------------------|---------------------|--------------------------------|
| Folículos | Repleto de células | Delgados e atrofiados |
| Celuridade dos folículos | Ricos em linfócitos | Rarefação difusa de linfócitos |
| Tecido conjuntivo interfolicular | Escasso | Espessado e mais frouxo |
| Epitélio de revestimento | Distendido | Retraído e papilífero |

Fonte: NAKAMURA (1986), RACHID (2002) e POPE (1991)

Para a avaliação histopatológica do timo, foram adotados os critérios utilizados por NAKAMURA (1986) e POPE, (1991) (Quadro 3). Em aves jovens, os lóbulos tímicos são separados por septos de tecido conjuntivo, a região cortical é ricamente povoada por timócitos, a medula tímica é relativamente de coloração mais pálida, com um número de linfócitos um pouco mais reduzido. Em aves imunossuprimidas, ocorre atrofia tímica, com perda de linfócitos da região cortical seguida pela região medular, observa-se necrose linfocítica, de um típico padrão denominada de “*starry-sky*” (aparência de céu em estrelas).

Quadro 3. Critérios para caracterização histológica do timo em aves normais e imunossuprimidas.

| Critérios | Aves normais | Aves imunossuprimidas |
|------------------|--|---|
| Córtex do timo | Rico em linfócitos | Rarefação de linfócitos, necrose tímica (“ <i>starry-sky</i> ”) |
| Medula do timo | Rica em linfócitos, porém menos que o córtex | Rarefação de linfócitos |

Fonte: NAKAMURA(1986); POPE(1991)

3.8 ANÁLISE ESTADÍSTICA

Aplicou-se a prova estatística de Shapiro-Wilk, bem como fez-se a inspeção dos gráficos de quantis (qqplot), com o objetivo de verificar se as observações das variáveis peso corporal (PC), razão peso do baço / peso corporal ($R_{\text{BAÇO}}$), razão peso da bursa / peso corporal (R_{BURSA}) e espessura da prega interdigital (EPI) apresentavam ou podiam ser aproximadas da distribuição normal. Aplicou-se a transformação logarítmica nas variáveis de razão entre peso do baço e peso corporal e razão entre peso da bursa e peso corporal, no intuito de aproximar tais variáveis da distribuição normal.

Para descrição das variáveis dependentes PC, $R_{\text{BAÇO}}$, R_{BURSA} , em função da variável independente grupo, bem como da variável EPI, em função das variáveis independentes grupo, tempo de inoculação e pata, utilizou-se a média e o desvio-padrão. Ao se analisar as diferenças observadas nas variáveis dependentes em função das variáveis independentes, além da aplicação da média e desvio-padrão, calculou-se o intervalo de confiança da média como medida de incerteza em relação à estimativa pontual, sendo que o coeficiente de confiança foi aceito em 95%.

Para verificar a significância da diferença entre grupos nas variáveis $R_{\text{BAÇO}}$ e R_{BURSA} , aplicou-se a análise de variância univariada. Por sua vez, para análise da significância da diferença para a variável EPI, fez-se uso da análise de

variância a três fatores mistos, num desenho 3×2×2 (três grupos, dois períodos de inoculação, pata direita e esquerda).

A significância estatística foi estabelecida em $\alpha = 0,05$, sendo que todo o processamento estatístico foi realizado no software estatístico R versão 2.2 (Copyright © 2005, Development Core Team).

4 RESULTADOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Eimeria*

No grupo I (controle), não foram observados oocistos de *Eimeria* nas fezes, assim como nenhuma lesão macroscópica ou microscópica compatível com a infecção.

Por sua vez, os animais do grupo II revelaram a presença de oocistos nas fezes correspondentes a *E. acervulina* e a *E. maxima*, de acordo com as médias tomadas a partir de 30 oocistos de cada espécie (Tab. 1). A necropsia destas aves revelou lesões macroscópicas no intestino delgado, com escore variando de +2 a +3, pela presença de petéquias na mucosa, espessamento da parede, notadamente no jejuno, e presença de secreção de coloração alaranjada misturada à secreção hemorrágica (Fig. 1 e 2).

Nas aves do grupo III, antes de proceder-se a administração de dexametasona, notou-se a ausência de coccídias ao exame de fezes. Entretanto, após o tratamento com dexametasona, observou-se a presença de 3 espécies de *Eimeria*: *E. acervulina*, *E. maxima* e *E. tenella*, de acordo com o tamanho médio dos oocistos (Tab. 1). A necropsia revelou lesões macroscópicas no intestino delgado e nos cecos. Observou-se, no intestino delgado, espessamento e distensão da parede, presença de petéquias na mucosa e secreção sangüinolenta e alaranjada, com escore variando de +2 a +3. Os cecos mostravam-se distendidos, com aspecto caseoso em algumas aves e o conteúdo mostrava-se hemorrágico em seu interior, com escore variando de +3 a +4 (Fig. 3 e 4).

Tabela 1. Tamanho médio dos oocistos de *Eimeria* identificados nas aves dos grupos II e III.

| Espécies de <i>Eimeria</i> | n | Média do comprimento x largura (μm) | Comprimento máximo-mínimo (μm) | Largura máxima-mínima (μm) | Razão entre largura/comprimento |
|----------------------------|----|--|---|---|---------------------------------|
| <i>E. acervulina</i> * | 30 | 16.2 x 14 | 17.5 – 15 | 16 – 12.5 | 0.88 |
| <i>E. maxima</i> * | 30 | 31.3 x 23.3 | 35 – 27.5 | 27.5 - 20 | 0.74 |
| <i>E. tenella</i> ** | 30 | 22.1 x 17.5 | 25 - 20 | 20 - 15 | 0.79 |

* indica espécies identificadas nos grupos II e III.

** indica espécie identificada no grupo III.

4.2 TESTE INTERDIGITAL DE FITOEMAGLUTININA: AVALIAÇÃO DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE BASOFÍLICA CUTÂNEA

Ao se analisar o comportamento da espessura da pata direita e esquerda em função do tempo de inoculação da PHA, observou-se uma interação estatisticamente significativa entre os fatores grupo, tempo de inoculação e pata. A partir desta interação, verificou-se que o aumento observado na pata direita dos animais dos três grupos foi significativamente superior à alteração obtida na pata esquerda. Por sua vez, o aumento observado na pata direita dos animais do grupo I foi significativamente maior que os aumentos observados nos animais dos grupos II e III (Tab.2).

Tabela 2. Comparação da espessura da prega interdigital pré-inoculação e pós-inoculação, nos grupos I, II e III.

| | Grupo I (mm) | | Grupo II (mm) | | Grupo III (mm) | |
|-------------|---------------------------|-------------|-----------------------------|-------------|-----------------------------|-------------|
| | Direita | Esquerda | Direita | Esquerda | Direita | Esquerda |
| <i>T0</i> | 1,43 (0,19) | 1,47 (0,20) | 1,51 (0,11) | 1,52 (0,13) | 0,98 (0,11) | 1,01 (0,12) |
| <i>T12</i> | 2,76 (0,44) | 1,55 (0,22) | 2,43 (0,20) | 1,55 (0,13) | 1,68 (0,17) | 1,08 (0,14) |
| <i>?(%)</i> | 91,66 (4,74) ^a | 5,63 (2,09) | 60,90 (2,15) ^{a,b} | 2,56 (0,75) | 72,43 (2,15) ^{a,b} | 7,11 (1,37) |

?: alteração percentual entre T0 e T12. Os dados para pré-inoculação e pós-inoculação são apresentados na forma de média (desvio-padrão). Os dados para ?% são apresentados na forma de média (coeficiente de confiança a 95%).

^a indica diferença estatisticamente significativa, $P = 0,001$; em relação ao ?% da pata esquerda do respectivo grupo

^b indica diferença estatisticamente significativa, $P = 0,001$; em relação ao ?% do grupo I para a pata direita.

4.3 RAZÃO ENTRE PESO CORPÓREO E PESO DOS ÓRGÃOS LINFÓIDES

Conforme a Tabela 3, o grupo III apresentou valores de $R_{BAÇO}$ e R_{BURSA} significativamente inferiores aos valores observados para os grupos I e II. As diferenças observadas entre os grupos I e II para $R_{BAÇO}$ e R_{BURSA} não foram estatisticamente significantes. É evidente a atrofia dos órgãos linfóides das aves do grupo III (Fig. 5, 6 e 7).

Tabela 3. Descrição do peso corporal; razão entre peso do baço e peso corporal e razão entre peso da bursa e peso corporal, em porcentagem, nos grupos I, II e III.

| | Grupo I | Grupo II | Grupo III |
|------------------------------|------------------|------------------|--------------------------------|
| <i>PC (g)</i> | 1917,14 (171,30) | 1988,75 (245,81) | 1556,00 (204,97) |
| <i>R_{BAÇO} (%)</i> | 0,1290 (0,0355) | 0,1277 (0,0247) | 0,0959 (0,0340) ^{a,b} |
| <i>R_{BURSA} (%)</i> | 0,0653 (0,0120) | 0,0756 (0,0216) | 0,0380 (0,0068) ^{c,d} |

PC: peso corporal; $R_{BAÇO}$: razão entre peso do baço e peso corporal; R_{BURSA} : razão entre peso da bursa e peso corporal. Os dados são apresentados na forma de média (desvio-padrão).

^a indica diferença estatisticamente significativa, $P = 0,014$; em relação ao grupo I.

^b indica diferença estatisticamente significativa, $P = 0,008$; em relação ao grupo II.

^c indica diferença estatisticamente significativa, $P = 0,001$; em relação ao grupo I.

^d indica diferença estatisticamente significativa, $P = 0,001$; em relação ao grupo II.

4.4 EXAMES HISTOPATOLÓGICOS

4.4.1 Órgãos Linfóides

A análise histológica do baço revelou apenas congestão nos animais dos grupos I e II. Nos animais do grupo III, além da congestão, notou-se acentuada e difusa rarefação linfóide.

Com relação ao timo, observou-se, nas aves do grupo III, acentuada atrofia com evidente redução do córtex, devida à intensa depleção linfocitária (Fig. 13). Nos grupos I e II, não foram observadas alterações no tamanho do córtex e da medula tímica, porém, em algumas aves do grupo II, notou-se espaços vazios com aparência de “céu em estrelas” – “*starry sky*” (necrose linfocítica) na zona cortical (Fig 11 e 12).

No grupo III, a bursa de Fabricius mostrava acentuada atrofia dos folículos e marcada depleção linfocitária difusa, tanto no córtex como na medula. Os folículos apresentavam-se retraídos e bem menores no tamanho, com a celularidade diminuída, perdendo, assim, a aparência de bem preenchidos para apresentarem-se adelgaçados e com hipocelularidade e revelando muitos espaços vazios, indicativos de perda linfocitária. O estroma no interior dos folículos mostrava-se mais evidente e o tecido conjuntivo interfolicular mais espessado. O epitélio de revestimento mostrava-se papiliforme, não totalmente distendido, acompanhando a retração dos folículos (Fig. 15). Nos grupos I e II, observou-se uma moderada rarefação linfóide no córtex e medula, com uma discreta diminuição e um adelgaçamento dos folículos (Fig.14).

4.4.2 Intestino

As lesões intestinais, ao exame histopatológico das aves do grupo II, caracterizavam-se por um infiltrado linfo-histiocitário intenso acometendo a mucosa do duodeno e jejuno. Nas áreas parasitadas observava-se atrofia vilosa, com necrose do epitélio da mucosa, e diferentes formas parasitárias das espécies

de *Eimeria*, tais como esquizontes, microgametas, macrogametas e oocistos.(Fig 18 e 20).

A análise histopatológica das aves do grupo III revelou um discreto infiltrado linfo-histiocitário no intestino delgado e nos cecos. A atrofia vilosa com necrose do epitélio da mucosa foi observada no intestino delgado e, principalmente, nos cecos, onde a atrofia foi bastante extensa (Fig.16). Uma grande quantidade de formas parasitárias de *Eimeria*, tais como esquizontes, microgametas, macrogametas e oocistos, foram encontradas no intestino delgado e nos cecos, estes com formas de *E. tenella* tanto nas áreas mais superficiais das vilosidades intestinais, quanto preferencialmente nas criptas (Fig.17 e 19).

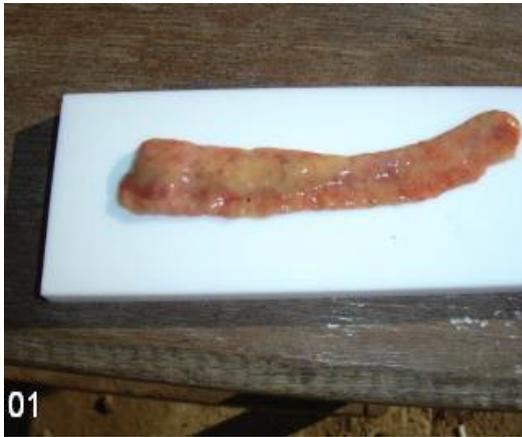


Figura 01. Presença de petéquias na mucosa duodenal de ave do grupo II.

Figura 02. Jejunum com conteúdo sangüinolento e alimento não-digerido em ave do grupo II, causado por *E.maxima*.

Figura 03. Cecos distendidos em ave do grupo III infectada por *E. tenella*.

Figura 04. Ceco de ave do grupo III com conteúdo hemorrágico.



Figura 05. Bursa de Fabricius atrofiada (na parte superior) em aves do grupo III em comparação com as aves do grupo I (na parte inferior).

Figura 06. Baço atrofiado (na parte superior) em aves do grupo III em comparação com aves do grupo I (na parte inferior).

Figura 07. Timo atrofiado (na parte superior) em aves tratadas por dexametasona em comparação com o timo de aves controles (na parte inferior).

Figuras 08. Lobos do timo de ave do grupo I.

Figuras 09. Lobos atrofiados do timo de ave do grupo III.

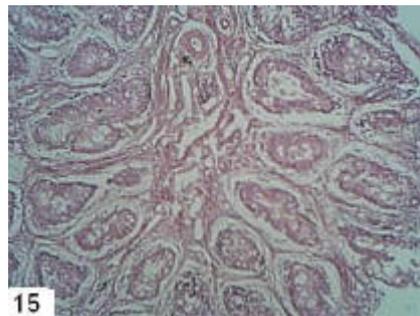
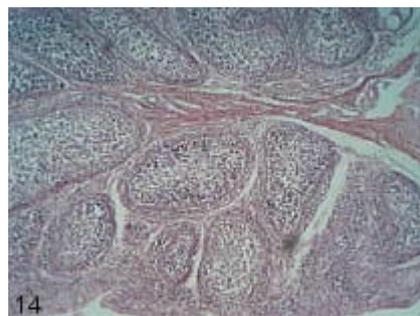
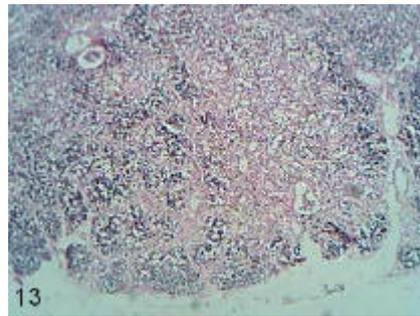
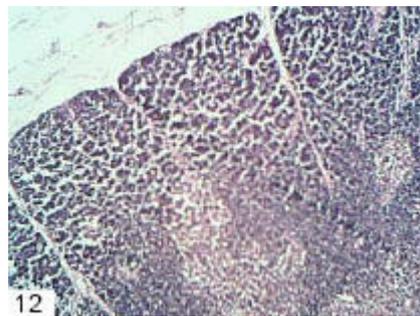
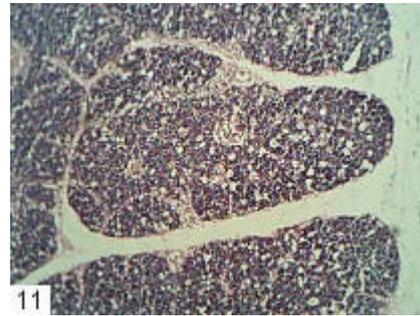
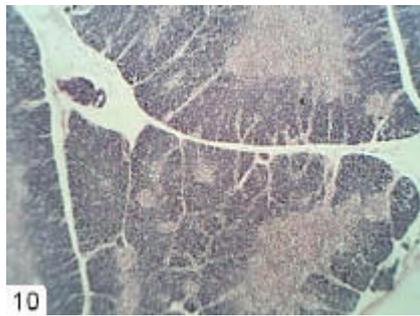


Figura 10. Corte histológico do timo de ave do grupo I, mostrando córtex bem pronunciado e envolvendo a medula. 40x.

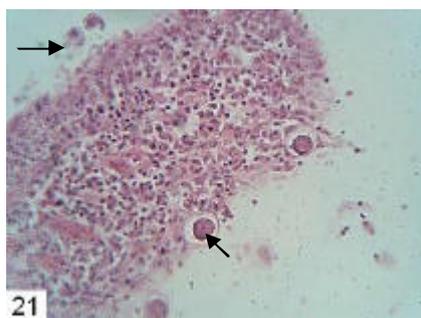
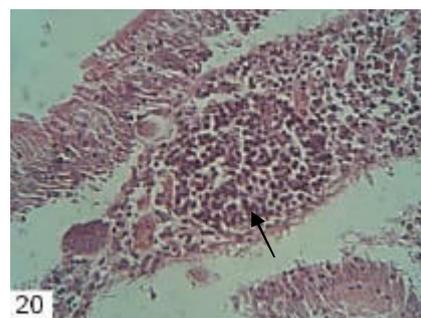
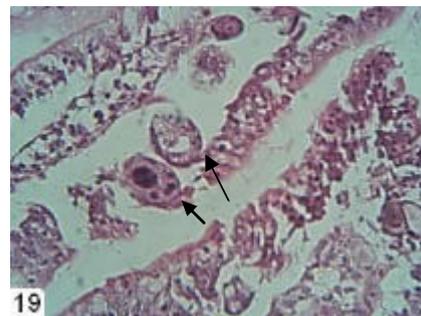
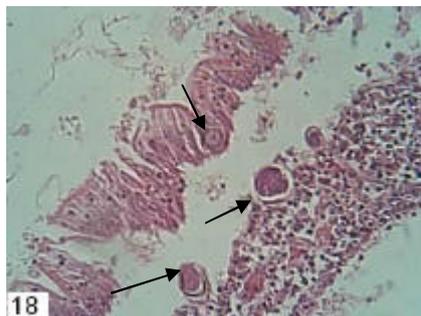
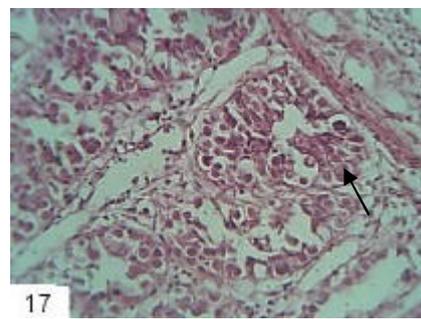
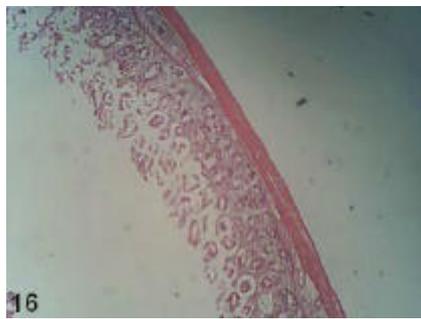
Figuras 11. Corte histológico de timo de ave do grupo II. Observa-se no córtex lesões do tipo "starry-sky", indicando necrose tímica.40x.

Figuras 12. Corte histológico de timo de ave do grupo II. Observa-se no córtex lesões do tipo "starry-sky", indicando necrose tímica.100x.

Figura 13. Corte histológico de timo de ave do grupo III, com acentuada atrofia do córtex.40x.

Figuras 14. Corte histológico da bursa de Fabricius de ave do grupo I, com folículos bem celularizados 40x.

Figuras 15. Bursa de ave do grupo III, com folículos retraídos e espaços vazios em seu interior, indicando depleção linfocitária. 40x.



- Figura 16.** Atrofia vilosa com necrose do epitélio da mucosa cecal de animais do grupo III. 40x.
Figura 17. Ausência de infiltrado linfo-histiocitário e grande quantidade de formas parasitárias de *E. tenella* em ceco de ave do grupo III. 400x.
Figura 18. Formas parasitárias de *E. maxima* próximas à lâmina própria da mucosa do intestino delgado em ave do grupo II. Nota-se a presença de infiltrado linfo-histiocitário.100x.
Figura 19. Necrose do epitélio da mucosa em ave do grupo III. Observa-se formas parasitárias de *E. tenella*. 400x.
Figura 20. Nódulo linfóide destacando-se na mucosa do intestino delgado em ave do grupo II.100x.
Figura 21. Presença de oocistos de *E. acervulina* e *E. maxima* no intestino delgado de ave do grupo II.100x.

5 DISCUSSÃO

Para avaliar a relação entre a ocorrência de coccidiose clínica e um estado de imunossupressão, optou-se por realizar o experimento a campo em aves criadas numa granja comercial de frangos de corte. Desta forma, pôde-se refletir as condições naturais para o surgimento espontâneo de um surto de coccidiose causado por diferentes espécies de *Eimeria* incidentes em frangos de corte.

A coccidiose geralmente costuma incidir entre a 3^o e a 5^o semana de vida das aves (MACDOUGALD, 1997 e KAWASOE, 2000). Na presente investigação, as aves do grupo II apresentaram coccidiose na 5^a semana de vida, seguindo o curso epidemiológico natural. Observou-se diarreia de coloração esbranquiçada ou alaranjada, com a presença de muco e/ou sangue, conforme descrito por BECKER (1948) em estudos anteriores.

No grupo II, foram descritos 2 tipos de oocistos de espécies de *Eimeria* - *E. acervulina* e *E. maxima*. Por sua vez, os animais do grupo III, que eram negativos antes do tratamento com dexametasona, apresentaram, além da presença das duas espécies de *Eimeria* citadas, também *E. tenella* após o tratamento imunossupressor. As infecções mistas causadas por mais de uma espécie de *Eimeria* tem sido descritas por BECKER (1948), entretanto, a observação de uma terceira espécie de *Eimeria* sugere maior suscetibilidade dos animais do grupo III em decorrência da imunossupressão induzida pela dexametasona, reforçando que o sistema imunológico desempenha papel

importante contra as coccídias. ISOBE e LILLEHOJ (1993) observaram diminuição na produção de IL-2 e IFN- γ por linfócitos de aves tratadas com dexametasona e aumento da suscetibilidade à *E. mivati*.

MONTASSIER (2000) descreveu que as espécies *E. acervulina* e *E. maxima* são as principais causadoras de perdas econômicas em granjas de frangos de corte nas quais não se faz uso de vacinação como método preventivo contra a coccidiose, podendo, eventualmente, ocorrer também surtos de *E. tenella*.

Para corroborar e assegurar a correta identificação das espécies de *Eimeria*, procedeu-se durante a necropsia uma meticulosa investigação do intestino, cujas lesões macroscópicas encontradas foram interpretadas segundo o escore preconizado por JOHNSON e REID (1970) e confirmaram os achados dos exames de fezes. A *E. maxima* e a *E. acervulina* determinaram lesões no intestino delgado, preferencialmente na porção média, acometendo as aves dos grupos II e III. Por sua vez, a *E. tenella* acometeu os animais do grupo III, causando lesões nos cecos.

As espécies de *Eimeria* têm por tecido-alvo o epitélio intestinal, sendo seletivas quanto ao sítio de parasitismo. O ciclo de vida da *Eimeria* é complexo, envolvendo diferentes estágios de vida. A resposta imune do hospedeiro contra este parasita também é complexa, sendo efetuada pelo tecido linfóide associado ao intestino, que se coloca como primeira linha de defesa contra a coccidiose. Em resposta a uma infecção por coccídia são ativadas tanto a resposta imune humoral como a resposta imune mediada por células, sendo a resposta imune celular a

que representa o principal papel na resistência contra a coccidiose (LILLEHOJ, 1999).

BENJAMINI *et al.* (2002) relataram que linfócitos T CD4+ são estimulados por antígenos e se diferenciam em 3 subgrupos - Th0, Th1 e Th2. Patógenos intracelulares, como as coccídias, promovem maior produção de células Th1, que sintetizam IL-2, IFN- γ e TNF- β . Estas citocinas ativam os linfócitos T CD8+, os macrófagos e as células NK (PAUL e SEDER, 1994). Sabe-se que diferentes espécies de *Eimeria* induzem a resposta do hospedeiro, ativando cada qual, de forma peculiar, os diferentes subtipos de linfócitos residentes na mucosa intestinal (ALLEN e FETTERER, 2002; LILLEHOJ, 1999).

A reação de CBH elicitada pela aplicação intradérmica de fitoemaglutinina tem sido empregada para avaliar a resposta timo-dependente mediada por célula em frangos. Este teste é usado como um método simples de avaliar *in vivo* a imunocompetência em frangos (CORRIER e DELOACH, 1990).

Os resultados do presente trabalho revelaram que houve um significativo aumento da espessura da prega interdigital nos animais do grupo I em relação aos outros grupos. Portanto, estes dados corroboram as observações feitas por outros autores em aves com *status* imunológico dentro da normalidade, confirmando que o teste de CBH à fitoemaglutinina é apropriado para a avaliação da resposta imune celular *in vivo*. Trata-se de um procedimento eficaz, efetivo e eficiente já que mede adequadamente a resposta imune celular, sem causar desconforto ao animal e possuindo baixo custo.

A imunossupressão experimental foi feita de acordo com CORRIER e DELOACH (1990), que utilizaram dexametasona na dose de 4 mg/kg por via subcutânea por 4 dias consecutivos. Embora existam vários fármacos imunossupressivos descritos na literatura corrente, a dexametasona foi empregada por ser de fácil administração, de baixo custo e não causar sofrimento para as aves no ato de sua inoculação (ISOBE e LILLEHOJ, 1993).

As aves do grupo III apresentaram significativa redução da resposta imune, a qual ficou evidente pela redução da reação de CBH à fitoemaglutinina e pela redução da relação entre o peso dos órgãos linfóides e o peso corporal.

Segundo BENJAMINI *et al.* (2002) e CORRIER e DELOACH (1990), o aumento na espessura da pele decorre de uma reação inflamatória local provocada pela liberação dos grânulos de basófilos. Aplicando o teste de CBH à fitoemaglutinina em aves neonatais timectomizadas, GOTO *et al.* (1978) obtiveram resposta extremamente diminuída ou ausente, sugerindo que a reação à fitoemaglutinina é timo-dependente. CORRIER e DELOACH (1990) compararam a resposta ao teste cutâneo ao mitógeno entre aves tratadas com dexametasona e aves não-tratadas, obtendo uma resposta significativamente menor nas aves tratadas com o glicocorticóide. No presente trabalho, a dexametasona diminuiu significativamente a reação de CBH provocada pela inoculação de fitoemaglutinina em relação ao grupo controle, concordando com os autores acima citados.

Segundo CORRIER *et al.* (1991); MORGULIS (1999); NAKAMURA *et al.* (1986) e POPE (1991), a diminuição do peso dos órgãos imunes de aves é utilizada como parâmetro para avaliação de imunossupressão. Os animais do

grupo III demonstraram uma significativa diminuição da razão entre o peso do baço e da bursa em relação ao peso corporal. Estes achados estão em concordância com os de CORRIER *et al.* (1991); GROSS *et al.* (1980) e NEISHABOURI *et al.* (2004), que demonstraram atrofia dos órgãos linfóides em animais imunossuprimidos com corticosteróides.

A avaliação macro- e microscópica do timo revelou evidente atrofia do mesmo nas aves imunossuprimidas pela dexametasona. Estes achados concordam com os relatos de GROSS *et al.* (1980), que observaram atrofia e diminuição no peso do timo com o uso de corticosteróides em frangos.

A análise histopatológica de todos os órgãos linfóides mostrou que a dexametasona causou uma potente ação imunossupressora, observada pela depleção linfocítica do timo, da bursa de Fabricius e do baço, além de causar diminuição do infiltrado linfo-histiocitário intestinal, corroborando os achados de CORRIER *et al.* (1991); GROSS *et al.* (1980) e ISOBE e LILLEHOJ (1993).

Os frangos do grupo II apresentaram significativa redução da reação de CBH à fitoemaglutinina, demonstrando que a coccidiose clínica ocorreu mediante uma deficiência na resposta imune celular.

Por outro lado, a relação entre o peso corporal e o dos órgãos linfóides foi semelhante à do grupo I. Sabe-se que a bursa de Fabricius é um órgão primário para linfócitos B e o baço é um órgão secundário para linfócitos B e T (TIZARD, 2002). Como a resposta imune no baço se relaciona tanto à celular como à humoral e a bursa é um órgão mais relacionado à resposta imune humoral, a manutenção dos pesos destes órgãos dentro da normalidade reforça que a

ocorrência de coccidiose é mais influenciada pela competência da imunidade celular e não da humoral (LILLEHOJ, 1999).

A imunossupressão é definida por um estado temporário ou permanente de disfunção da resposta imune provocada por uma injúria no sistema imune. A consequência mais evidente do estado de imunossupressão é o aumento da suscetibilidade a doenças infecciosas e parasitárias. A influência exercida por fatores ambientais e de manejo sobre o funcionamento do sistema imune dos animais pode contribuir para o agravamento do estado de imunossupressão. Vários são os tipos de agentes imunossupressores que afetam aves e mamíferos, destacando-se vírus, toxinas microbianas, estado de deficiência de certos nutrientes e fatores ambientais indutores de estresse. DOHMS e SAIF (1984) e MONTASSIER (2000) sugeriram que as aves com coccidiose podem estar sofrendo dano em seus órgãos linfóides por algum agente ou por um conjunto de fatores, o que aumentaria a suscetibilidade às coccídias. Embora alguns autores tenham relacionado a ocorrência de coccidiose a estados de imunossupressão induzidos experimentalmente, a constatação deste fato em condições naturais tem sido pouco relatada na literatura, o que reforça a importância deste estudo. Diante da possibilidade de se avaliar a resposta imune *in vivo* com um teste de baixo custo como foi demonstrado neste trabalho, pode-se empregar estas evidências na tentativa de identificação das causas de imunossupressão presentes no dia a dia de uma granja de criação comercial de frangos comercial que possam estar relacionadas a ocorrência de coccidiose.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados observados neste trabalho pode-se concluir que:

- Houve relação estatisticamente significativa entre a ocorrência de coccidiose clínica em frangos de corte criados comercialmente e imunossupressão.
- A imunossupressão experimentalmente induzida por dexametasona aumentou a suscetibilidade à coccidiose.
- A reação de CBH mostrou-se eficiente para a análise de imunidade celular a campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K. Hipersensibilidade Imediata. In: ABBAS, A.K.; Lichtman A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro Livraria: Livraria e Editora Revinter, 2003. p. 424-443.

ALLEN, P. C.; FETTERER, R. H. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* Species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, p.58-65, 2002.

BASEDOVSKY, H. O.; SORKIN, E.; FELIX, D.; HAAS, H. Hypothalamic changes during the immune response. **Europe Journal of immunology**, v. 7, p; 323-325, 1977.

BECKER, E. R. Protozoa. In: BIESTER, H. E.; SCHUART, L. H. **Diseases of Poultry**. 2. ed. Ames: The Iowa State College, 1948. p. 875-880.

BEFUS, A. D.; JOHNSON, N.; LESLIE, G. A.; BIENENSTOCK, J. GUT -Associated Lymphoid Tissue in the Chicken. **The Journal of Immunology**, v. 125, p. 2626-2632, 1980.

BENJAMINI, E.; COICO, R.; GEOFFREY, S. Reações de Hipersensibilidade: Mediada por Células T, Tipo IV – do tipo tardio. In: BENJAMINE, E.; COICO, R.; GEOFFREY, S. **Imunologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 187-193.

BIGGS, P. M.; THORPE, R. J.; PAYNE, L. N. Studie of genetic resistance to Marek' disease in the domestic chicken. **Poultry Science**, v. 9, p. 37-52, 1968.

CALNEK, B. W. Neoplastic Diseases. In: CALNEK, B. W. 10 ed. **Diseases of Poultry**. Iowa: Iowa State University Press, 1997. p.369-392.

CALNEK, B. W.; HARRIS, R. W.; BUSCAGLIA, C.; SCHAT, K. A.; LUCIO, B. Relationship between the immunosuppressive potential and pathotype of Marek's disease virus isolates. **Avian Diseases**, v. 42, p: 124-132, 1998.

CHO, Y.; EDGARD, S. A. Characterization of infectious bursal disease. **Poultry Science**, v. 51, p. 60-69, 1972.

CHROUSOS, G. P.; LORIOUX, D. L.; GOLD, P. W. Introduction, the concept of stress and its historical development. In: CHROUSOS, G. P. LOURIAUX D. L.; GOLD, P. W. 1 ed. **Mechanism of physical and emotional stress**. New York: Plenum Press, 1988. p. 3-7.

CORRIER, D. E. Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.30, p. 73-87, 1991.

CORRIER, D. E.; DELOACH, J. R. Interdigital skin test for evaluation of delayed hypersensitivity and cutaneous basophil hypersensitivity. **The American Journal Veterinary Research**, v. 6, p. 950-954, 1990.

CORRIER, D. E.; ELISSALDE, M. H.; ZIPRIN, R. L.; DELOACH, J. R. Effect of Immunosuppression with Cyclophosphamide, Cyclosporin, or Dexamethasone on *Salmonella* Colonization of Broiler Chicks. **Avian Diseases**, v. 35, p. 40-45, 1991.

CUI, H.; XI, P.; JUNLIANG, D.; DEBING, L.; GUANG, Y. Pathology of lymphoid organs in chickens fed a diet deficient in zinc. **Avian Pathology**, v. 33, p. 519-525, 2004.

DANFORTH, D.; RUFF, M. D. Quimioterapia: mecanismo de indução de resistência às drogas anti-coccidianas. In SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COCCIDIOSE-AVIÁRIA, 2., 1999, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Facta, 1999. p. 45-51.

DAVDISON, M. K.; KEDEM, M.; BOROCHOVITZ, H.; KASS, N.; AYALI, G.; HAMZANI, E.; PERELMAN, B.; SMITH, B.; PERK, S. Chicken infectious anemia virus in Israeli commercial flocks: amplification, clinical signs, performance and antibody status. **Avian Diseases**, v. 48, p. 108-118, 2004.

DIETERT, R. R.; GOLEMBOSKY, K. A. Environment-immune interactions. **Poultry Science**, v. 72, p. 1062-1076, 1994.

DOHMS, J. E.; MERTZ, A. Stress: mechanisms of immunosuppression. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 30, p. 89-109, 1991

DOHMS, J. E.; SAIF, Y. M. Criteria for evaluating immunosuppression. **Avian Diseases**, v. 28, p. 305-310, 1984.

EDDS, G. T.; NAIR, K. P. C.; SIMPSON, C. F. Effect of aflatoxin B 1 on resistance in poultry against cecal coccidiosis and Marek's disease. **American Journal Veterinary Research**, v. 34, p. 819-826, 1973.

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

GIAMBRONE, J. J.; DIENER, U. L.; WYATT, R. D.; EIDSON, C. S. Effect of aflatoxin on the humoral and cell-mediated immune systems of the chickens. **American Journal Veterinary Research**, v. 39, p. 305-308, 1978.

GORYO, M.; HAYASHI, S.; UOSHISAWA, K.; UMEMURA, T.; ITAKURA, C.; YAMASHIRO, S. Ultrastructure of the thymus in thymus chicken inoculated with chicken anemia virus agent (MSBI –TK 5803 strain). **Avian Pathology**, v. 18, p. 605-617, 1989.

GOTO, N.; KODAMA, Y.; OKADA, K.; FUJIMOTO, Y. Suppression of phytohemagglutinin skin response in thymectomized chickens. **Poultry Science**, v. 57, p. 246-250, 1978.

GRIFFIN, J. F. T. Stress and immunity; a unifying concept. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 20, p. 263-312, 1989.

GROSS, W. B.; SIEGEL, P. B.; DUBOIS, R. T. Some effects of feeding corticosterone to chickens. **Poultry Science**, v. 59, p. 516-522, 1980.

HAGOOD, L. T.; KELLY, T. F.; WRIGTH, J. C.; HOERR, F. J. Evaluation of chicken infectious anemia virus and associated risk factors with diseases and production losses in broilers. **Avian Diseases**, v. 44, p. 803-808, 2000.

HOERR, F. J. Micitoxocoses. In: CALNEK, B. W. 10 ed.. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State University Press, 1997. p. 962-963.

HSIEH, D. P. H. Mode of action of mycotoxin. In: KROGH, P. **Micotoxins in food**. 6. ed. San Diego: Academic Press, 1987. p. 149-176.

HUFF, W.E.; M. D. Ruff. *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections in ochratoxin A – compromised broiler chicken. **Poultry Science**, v. 61, p. 685-692, 1982.

ISOBE, T.; LILLEHOJ, H. S. Effects of corticosteroids on Lymphocyte Subpopulations and Lymphokine Secretion in Chicken. **Avian Diseases**, v. 36, p, 590-596, 1992.

ISOBE, T.; LILLEHOJ, H. S. Dexamethasone suppresses T cell-mediated immunity and enhances diseases susceptibility to *Eimeria mivati* infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 39, p. 431-445, 1993.

JOHNSON, J.; REID, W. M. Anticoccidial drugs; Scoring techniques in Battery and Floor-Pen Experiments with Chickens. **Experimental Parasitology**, v. 28, p. 30-60, 1970.

KATIYAR, A. K.; VEGAD, J. L.; AWADHIYA, R. P. Increased vascular permeability and leucocyte emigration in *Escherichia coli* endotoxin injury in the chicken skin. **Research Veterinary Science**, v. 52, p.154-161, 1992.

KAWASOE, U. Coccidiose. In: BERQUIERI, A. B.; MACARI, M. **Doença das aves**, 1. ed. Campinas: Facta, 2000. p. 391-401.

KLASSING, K. C. Interactions Between Nutrition and Infections Diseases. In: CALNEK, B. W. 10. ed. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State University Press, 1997. p. 73-79.

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

LATSHAW, J. D. Nutrition-mecanismos of immunosuppression. **Veterinary Immunology and Immunopatology**, v. 30, p. 111-119, 1991.

LILLEHOJ, H. S. Imunologia em Coccidiose Aviária. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COCCIDIODE AVIÁRIA, 2., 1999, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Facta, 1999. p. 23-33.

LONG, P. L.; ROSE, M. D. Extended eschizogony of *Eimeria mivati* in bethametazone-treated chickens. **Parasitology**, v. 60, p. 147-155, 1970.

LUKERT, P. D.; SAIF, Y. M. Infection bursal disease. In: CALNEK, B. W. 10. ed. **Disiases of poultry**. Iowa: Iowa State University Press, 1997. p. 721-731.

MARSH, J. A.; COMBS JR., G. F.; WHITRAKE, M. E.; DIERTERT, R. R. Effect of selenium and vitamin E dietary deficiencies on chicken lymphoid organ development. **Proceedings Society Experimental Biology Medical**, v. 166, p. 228-230, 1986.

MCCONEL, C. D. G.; ADAIR, B. M.; MCCONEL, C. D. G.; ADAIR, B. M.; McNULTRY, M. S. Effects of chicken anemia virus on cell-mediated immune function in chickens exposed to the virus by a natural route. **Avian Diseases**, v. 37, p. 366-374, 1993.

MCDUGALD, L. R. Protozoa. In: CALNEK, B. W. 10. ed. **Diseases of Poultry**. Iowa: Iowa State University Press, 1997. p. 865-883.

MONTASSIER, H. J. Enfermidades do sistema imune. In: BERCHIERI, A. B.; MACARI, M. **Doença das aves**. 1. ed. Campinas: Facta, 2000. p. 133-150.

MORGULIS, M. S. F. A. **Efeitos do diazepam sobre a resposta immune em frangos de corte**. 1999. 158 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1999.

NAKAMURA, K.; IMADA, Y.; MAEDA, M. Lymphocytic depletion of bursa de Fabricius and thymus in chickens inoculated with *Escherichia coli*. **Veterinary Pathology**, v. 23, p. 712-717, 1986.

NEISHABOURI, E. Z.; HASSAN, Z. M.; AZIZI, E.; OSTAD, S. N. Evaluation of immunotoxicity induced by diazinon in C57bl/6 mice. **Toxicology**, v. 196, p. 173-179, 2004.

NI, Y.; KEMP, M. C. A comparative study of avian reovirus pathogenicity: virus spread and replication and introduction of lesions. **Avian Diseases**, v. 39, p. 554-566, 1995.

OGASSAWARA, S.; KASAI, N.; PENA, H.F.J. **Cryptosporidium tipo parvum TYZZER, 1912, em gatos e cães da cidade de São Paulo**. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, Bagé, 1989. Anais. Bagé, Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1989, p.25-9.

ORTATATLI, M.; OGUZ, H. Ameliorative effects of dietary clinoptilolite on pathological changes in broilers chickens during aflatoxicosis. **Research Veterinary Science**, v. 71, p.59-66, 2001.

OWOADE, A. A.; OLUWAYELU, D. O.; FAGBOHUN, O. A.; AMMERLAAN, W.; MULDER, M. N.; MULLER, C.P. Serologic evidence of Chicken Infectious Anemia in commercial chicken flocks in Southwest Nigeria. **Avian Diseases**, v. 48, p. 202-205, 2004.

PAUL, W. E.; SEDER, R. H. Lymphocyte response and cytokines. **Cell**, v. 76, p. 241-251, 1994.

PIER, A. C.; RICHARD, J. L.; CYSEWSKI, S. J. Implications of micotoxins in animal disease. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 176, p. 719-724, 1980.

PIMENTEL, J. L.; COOK, M.E.; GREGER, J.L. Imune reponses of chickis fed various levels of zinc. **Poultry Science**, v. 70, p: 947-954, 1991.

POPE, C. R. Pathology of lymphoid organs with emphasis on immunosuppression. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 30, p. 31-44, 1991.

RACHID, M. A.; VASCONCELOS, A. C.; NUNES, V. A. Apoptose na depleção linfocitária induzida pela toxina T-2 em frangos de corte. Histomorfometria da bolsa de Fabrício. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 592-598, 2002.

RUFF, M. D. Epidemiologia da Coccidiose Aviária. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COCCIDIOSE AVIÁRIA, 2., 1999, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Facta, 1999. p. 1-4.

RUFF, M. D.; ROSENBERGER, J. K. Concurrent Infections with Reovirus and Coccidia in Broilers. **Avian Diseases**, v. 29, p. 465-478, 1985.

SANTIN, E. Micotoxicoses. In: BERCHIERI, A. J.; MACARI, M. **Doenças das aves**. 1. ed. Campinas: Facta, 2000. p. 379-388.

SCOFIELD, V. L.; BOSE JR., H. R. Depression of mitogen response in spleen cells from reticuloendotheliosis virus-infected chickens and their suppressive effect on lymphocyte response. **Journal of Immunology**, v. 120, p. 1321-1325, 1978.

SHARMA, J. M.; KARECA, K.; PERTILE, T. Virus-induced immunosuppression in chickens. **Poultry Science**, v. 73, p. 1082-1086, 1994.

SHARMA, J. M.; ROSENBERGER, J. K. Infectious bursal disease and reovirus infection of chickens: immune responses and vaccine control. In: TOIVANEN, A.; TOIVAINEN, P. **Avian immunology: basis and practice**. Boca Raton: CRC Press, 1987. v. 2, p. 150-157.

SIMON, W. A.; ISHISUKA, M. M. Doença infecciosa da Bolsa de Fabrício. In: BERCHIERI, A. J. e MACARI, M. **Doença das Aves**. 1 ed. Campinas: Facta, 2000, p. 301-314.

SMITH, R. E.; VAN ELDIK, L. J. Characterization of immunosuppression accompanying virus-induced avian osteopetrosis. **Infectious Immunology**, v. 22, p. 452-461, 1978.

STARDECKER, M. J.; LUKIC, M.; DVORAK, A.; LESKOWITZ, S. The cutaneous basophil response of phytohemagglutinin in chicken. **The Journal of Immunology**, v.118, p. 1564-1568, 1977.

TIZARD, I. R. Defeitos imunológicos secundários. In: TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**. 6. ed. São Paulo; Rocca, 2002. p. 463-477

TIZARD, I. R. Órgãos do sistema imune. In: TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária: uma introdução**, 6. ed. São Paulo: Rocca, 2002 p. 76-92.

VERMA, J.; JOHRI, T. T.; SWAIN, B. K.; AMEENAS, S. .Effect of graded level of aflatoxin, ochratoxin and their combinations on the performance and imunerespnse in broilers. **Poultry Science**, 45, p. 512-528, 2004.

WITHERS, D. R.; YOUNG, J. R.; DAVISON, T. R. Infection bursal disease virus – induceted immnosuppression in the chickens is associated with the presence of undifferentiated follicles in recovering bursa. **Viral Immunology**, v.18, p. 127-137, 2005.

WITTER, R. L. Reticuloendotheliosis. In: CALNEK, B. W. 10. ed. **Diseases of poultry**. Iowa: Iowa State University Press, 1997. p.467-484.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)