

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR APÓS A VACINA DE *Salmonella*
GALLINARUM EM AVES INTOXICADAS COM AFLATOXINAS**

Dissertação de Mestrado

Abrahão Carvalho Martins

PORTO ALEGRE

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR APÓS A VACINA DE *Salmonella*
GALLINARUM EM AVES INTOXICADAS COM AFLATOXINAS**

Autor: Abrahão Carvalho Martins

**Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de Sanidade Avícola**

**Orientador: Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do
Nascimento**

**PORTO ALEGRE
2018**

CIP - Catalogação na Publicação

Martins, Abrahão Carvalho

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR APÓS A VACINA
DE SALMONELLA GALLINARUM EM AVES INTOXICADAS COM
AFLATOXINAS / Abrahão Carvalho Martins. -- 2018.
78 f.

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Salmonella Gallinarum. 2. Imunidade. 3.
Aflatoxinas. 4. Poedeiras Comerciais. 5. Citometria
de Fluxo. I. Nascimento, Vladimir Pinheiro do,
orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Abrahão Carvalho Martins

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR JUNTO A VACINA DE *Salmonella*
GALLINARUM EM AVES IMUNOESTIMULADAS COM AFLATOXINAS**

Aprovado em: 26/02/2018

APROVADO POR:

Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes
Membro da Comissão

Dr. Ricardo Hummes Rauber
Membro da Comissão

Dr. Thales Quedi Furian
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo.

Gostaria de agradecer a toda minha família pelo apoio sempre presente nas minhas escolhas pessoais e profissionais.

Agradeço a todos os colegas, funcionários e professores do CDPA da UFRGS, principalmente pelas colaborações realizadas durante a apresentação interna do projeto.

Um agradecimento especial ao orientador prof. Dr. Vladimir P. Nascimento pelas suas contribuições e oportunidades ofertadas. Agradeço também ao meu amigo Dr. Ricardo Rauber por todo o incentivo e ajuda.

Gostaria de agradecer também ao amigo Fernando Tamames III e a toda família Special Nutrients juntamente com os meus colegas da Amercian Nutrients; principalmente por me ausentar das minhas funções em prioridade ao projeto.

Também gostaria de agradecer a toda equipe do SAMITEC, especialmente aos amigos Leandro Giacomini e Diego Sturza, ajudando diretamente para o desenvolvimento do projeto.

Não poderia deixar de agradecer a toda equipe IMUNOVA da UFPR, por toda atenção e ajuda na execução do experimento.

Agradeço à empresa Mercoaves pela doação das aves em períodos pré-avaliativos e também ao meu amigo Carmo Wiebusch pelo auxílio junto à nutrição das aves.

RESUMO

O objetivo da pesquisa foi avaliar o comportamento das células do sistema imune após a aplicação da vacina SG9R (*Salmonella Gallinarum*), correlacionando a intoxicação de aflatoxinas (AFLA) em poedeiras comerciais com e sem adsorvente (AAM) na dieta. Foram utilizadas poedeiras comerciais de linhagem Brown com um dia de idade. A vacina foi utilizada de forma subcutânea na região dorsal do pescoço, aplicando 0,2 ml por ave. As coletas de sangue foram realizadas 3, 14 e 21 dias após a vacinação. Durante o experimento foram utilizadas duas doses de Aflatoxinas (1 e 2,5 ppm) e duas concentrações de adsorvente (1 e 2,5 kg/ton), de acordo com os seguintes tratamentos: T1 (controle); T2: 9R + 2,5 ppm AFLA + 2,5 kg/ton AAM; T3: 9R; T4: 9R + 2,5 ppm AFLA; T5: 2,5 ppm AFLA; T6: 2,5 ppm AFLA + 2,5kg/ ton AAM; T7: 9R + 1 ppm AFLA; T8: 9R + 1 ppm AFLA + 1 kg/ton AAM. As aves começaram a consumir AFLA/AAM desde o primeiro dia. As células avaliadas foram: linfócitos T citotóxicos de mucosa ($CD4^-TCRV\beta1^+$), linfócitos T citotóxicos ativados ($CD8^+CD28^-$), linfócitos T auxiliares de mucosa ($CD4^+TCRV\beta1^+$), linfócitos B ($Bu-1a^+$), monócitos (Kul^+MHCII^+), monócitos fagocíticos (%) e heterófilos fagocíticos (%). Os marcadores celulares foram interpretados por citometria de fluxo. A vacina SG9R reduziu de forma significativa ($p<0,05$) a concentração de linfócitos T citotóxicos ativados ($CD8^+CD28^-$), tornando esse marcador um bom parâmetro para ser analisado antes e após a imunização com SG9R. Os monócitos (Kul^+MHCII^+), apresentaram aumento estatisticamente significativo ($p<0,05$) de concentração após a vacinação. As aflatoxinas demonstraram um efeito supressivo sobre os linfócitos T auxiliares de mucosa ($CD4^+TCRV\beta1^+$), linfócitos T auxiliares periféricos ($CD4^+TCRV\beta1^-$) e linfócitos T citotóxicos de mucosa ($CD4^-TCRV\beta1^+$) em aves vacinadas, apresentando diferença significativa ($p<0,05$) nas coletas com 3 e 14 dias após a vacinação. A inclusão de 2,5 kg/ton de adsorvente na ração na presença da vacina, neutralizou os efeitos da aflatoxicose relatados acima, especialmente nas concentrações de linfócitos T auxiliares de mucosa ($CD4^+TCRV\beta1^+$), linfócitos T auxiliares periféricos ($CD4^+TCRV\beta1^-$) e linfócitos T citotóxicos de mucosa ($CD4^-TCRV\beta1^+$). As concentrações dessas células aumentaram significativamente ($p<0,05$) 21 dias após a vacinação. Portanto, a concentração de células do sistema imune pode apresentar diferenças após a vacina SG9R. Os efeitos supressivos das aflatoxinas junto a população de linfócitos T ficaram evidentes após a vacinação. No entanto, esses efeitos foram neutralizados quando utilizado 2,5 kg/ton de adsorvente na ração.

Palavras-chave: Tifo Aviário; Aflatoxinas; Aditivo Antimicotoxinas.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the behavior of some specific immune cells after applying SG9R (Salmonella Gallinarum) live vaccine. The effect of adding Aflatoxin (AFLA) and an anti-mycotoxin adsorbent to the rations was also evaluated. One-day-old commercial layers were used in this experiment. Each bird was vaccinated subcutaneously in the neck with 0.2 ml of the vaccine. Blood samples were collected at 3, 14 and 21 days post vaccination. The concentrations of the Aflatoxins mixed in the feed in the trial were 1 and 2.5 ppm (1 and 2.5 kg/ton). The concentrations of the anti-mycotoxins adsorbent used were 1-2.5 kg / ton. The following treatments were used: T1: control; T2: 9R + 2.5 ppm AFLA + 2.5 kg/ton AAM; T3: 9R; T4: 9R + 2.5 ppm AFLA; T5: 2.5 ppm AFLA; T6: 2.5 ppm AFLA + 2.5 kg/ton AAM; T7: 9R + 1 ppm AFLA; T8: 9R + 1 ppm AFLA + 1 kg/ton AAM. Birds started consuming Aflatoxin and the anti-mycotoxin adsorbent at one day of age. The following cells were evaluated: peripheral helper T lymphocytes ($CD4^+TCR\gamma\beta1^-$), helper T lymphocytes of mucosa ($CD4^+TCR\gamma\beta1^+$), cytotoxic T lymphocytes of mucosa ($CD4^-TCR\gamma\beta1^+$), Activated cytotoxic T lymphocytes ($CD8^+CD28^-$), B lymphocytes ($Bu-1a^+$), monocytes (Kul^+MHCII^+), phagocytic monocytes (%) and phagocytic heterophils (%). Cells markers were measured by flow cytometry. SG9R vaccination significantly decreased ($p<0.05$) the concentration of activated cytotoxic T lymphocytes ($CD8^+CD28^-$). Making this marker a good parameter to be analyzed before and after immunization with SG9R. The monocytes (Kul^+MHCII^+) presented a statistically significant increase ($p<0.05$) in concentration after vaccination. In the treatments where aflatoxins were present we detected a large suppressive effect on the mucosal helper T lymphocytes ($CD4^+TCR\gamma\beta1^+$), peripheral helper T lymphocytes ($CD4^+TCR\gamma\beta1^-$) and cytotoxic T lymphocytes of mucosa ($CD4^-TCR\gamma\beta1^+$) in vaccinated birds. With significant difference ($p<0.05$) in the collections with 3 and 14 days after vaccination. The inclusion of 2.5 kg of the adsorbent in the diet per tonne of feed neutralized the effects of aflatoxicoses reported above, especially in the concentrations of helper T lymphocytes of mucosa ($CD4^+TCR\gamma\beta1^+$), peripheral ($CD4^+TCR\gamma\beta1^-$) and cytotoxic of mucosa ($CD4^-TCR\gamma\beta1^+$). Increasing the concentration of these cells in the significant difference ($p<0.05$) 21 days after vaccination. Therefore, the concentration of immune system cells may show differences after the SG9R vaccine. The suppressive effects of aflatoxins on the T lymphocyte population were evident after vaccination. However, these effects were neutralized with 2.5 kg / ton of adsorbent.

Keywords: Fowl Typhoid; Aflatoxins; Anti-mycotoxin Additive.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistemas de isoladores.....	34
Figura 2 - Fígado do tratamento controle (T1).....	42
Figura 3 - Fígado de aves que receberam apenas a vacina 9R (T3).....	42
Figura 4 - Fígados de aves intoxicadas sem adsorvente na dieta.....	43
Figura 5 - Fígados de aves intoxicadas com adsorvente na dieta.....	43
Figura 6 - Fragmento de fígado do grupo T5.....	44
Figura 7 - Fragmento de fígado do grupo T5.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividades desenvolvidas.....	36
Tabela 2 – Desenho experimental.....	36
Tabela 3 – Reagentes utilizados para detecção de parâmetros imunes	39
Tabela 4 – Concentração de micotoxinas na dieta das aves	40
Tabela 5 – Peso das Aves.....	41
Tabela 6 – Linf. B em relação ao total de células imunes no sangue	46
Tabela 7 – Linf. T aux. periféricos em relação ao total de células imunes no sangue	47
Tabela 8 – Linf. T aux. de mucosas em relação ao total de células. imunes no sangue	49
Tabela 9 – Linf. T citx. de mucosas em relação ao total de células imunes no sangue	51
Tabela 10 – Linf. T citx. ativados em relação ao total de células imunes no sangue	52
Tabela 11 – Monócitos em relação ao total de células imunes no sangue	54
Tabela 12 – Heterófilos Fagocíticos em relação ao total de células imunes no sangue	56
Tabela 13 – Monócitos Fagocíticos em relação ao total de células imunes no sangue	57

LISTAS DE ABREVIATURAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CDPA	Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária
DAMPs	<i>Damage associated molecular patterns</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IN	Instrução Normativa
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
PPB	Partes por Bilhão
PPM	Partes por Milhão
PPRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SG	<i>Salmonella Gallinarum</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
	2.1 Imunidade das aves	14
	2.2 Órgãos e tecidos linfoides das aves	14
	2.3 Imunidade natural ou inata	15
	2.3.1 Receptores de reconhecimento de padrões (PPRs).....	15
	2.3.2 Defensinas.....	16
	2.3.3 Células dendríticas	16
	2.3.4 Fagócitos.....	17
	2.3.5 Inflamação	18
	2.3.6 Células Natural Killer (NK)	19
	2.3.7 Sistema complemento	20
	2.3.8 Interferons.....	20
	2.4 Imunidade adquirida ou específica	21
	2.4.1 Linfócitos.....	22
	2.4.2 Linfócitos T	22
	2.4.3 Linfócitos B	25
	2.5 Tifo aviário	26
	2.6 Aflatoxinas	29
3	OBJETIVOS	33
	3.1 Objetivo geral	33
	3.2 Objetivos específicos	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
	4.1 Local do experimento	34

	4.2 Aves utilizadas	34
	4.3 Alojamento	34
	4.4 Alimento	35
	4.5 Análises complementares (Comprovação de Intoxicação)	35
	4.6 Desenho experimental	35
	4.7 Cronograma de atividades	36
	4.8 Vacinação	36
	4.9 Aflatoxinas	37
	4.10 Aditivo antimicotoxinas	37
	4.11 Coleta de sangue	37
	4.12 Isolamento das células mononucleares	37
	4.13 Marcação para análise por citometria de fluxo	38
	4.14 Reagentes e células avaliadas	38
	4.15 Citometria de fluxo	38
	4.16 Análise estatística	39
5	RESULTADOS	40
	5.1 Resultados complementares	40
	5.2 Células do sistema imune	45
6	DISCUSSÕES	57
7	CONCLUSÃO	63
8	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

A avicultura representa mais de 40% da produção de proteína animal brasileira, deixando o setor avícola entre os mais importantes setores de produção pecuário do Brasil, colocando o país como segundo maior produtor de carne de frango do mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (FAO, 2017). A produção média de pintos de corte no Brasil em 2016 foi de 6,5 bilhões, totalizando um volume de produção de carne de 13,5 milhões de toneladas (APINCO, 2017).

Já a avicultura de postura comercial totalizou 39,2 bilhões de ovos, índice de redução inferior a 1% comparado ao ano de 2015. Mesmo com essa involução, a produção de ovos teve bons índices de crescimento nos últimos anos. Na década anterior (2001-2010), o volume de ovos produzidos evoluiu 3,4% ao ano, enquanto no decorrer da presente década, a expansão anual atinge 4,3%. Isso fica mais perceptível na evolução do consumo per capita do último septênio, quando saltou de 148 ovos em 2010 para 190 ovos consumidos por habitante no Brasil em 2016 (ABPA, 2017).

Ao contrário do setor de frango de corte, onde existe uma padronização de produção já estabelecido por empresas integradoras, o setor de postura comercial ainda apresenta uma grande diversidade de sistemas produtivos, aumentando os riscos de ordem sanitária. A organização mundial de saúde animal enumerou 118 doenças de notificação obrigatória, onde 13 delas afetam diretamente a avicultura industrial, com distinção especial à influenza aviária, doença de Newcastle, Micoplasmoses, Laringotraqueíte Infecciosa e Salmoneloses (OIE, 2018).

Salmonelose aviária é o termo utilizado para designar três doenças provocadas pelas bactérias do gênero *Salmonella* em aves: a Pulrose, causada por *Salmonella Pullorum* (SP); o Tifo Aviário (TA), cujo o agente etiológico é *Salmonella Gallinarum* (SG); e o Paratifo Aviário, causado pelos demais sorovares de *Salmonella*. (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). O Tifo Aviário é caracterizado como uma doença sistêmica severa que causa perdas econômicas na avicultura mundial, provocando alta morbidade e mortalidade, queda na produção de ovos e pintos de baixa qualidade (BERCHIERI JÚNIOR, 2001).

Salle e Moraes (2009) ressaltam que princípios de biosseguridade devem ser seguidos para prevenir doenças importantes. Medidas de controle, tais como seleção cuidadosa do fornecimento de pintos, programas de limpeza e desinfecção de instalações, vazios sanitários, cuidados com o descarte de animais mortos, desinfecção de veículos, controle de vetores, fornecimento de água e ração de qualidade são as principais ações para a prevenção do tifo

aviário (BRADEN, 2006). No entanto, vacinas vivas têm sido adotadas com maior frequência para a prevenção desta doença e fazem parte dos programas sanitários da atual indústria avícola de postura no Brasil (ZANCAN, 2013). Segundo Barrow e Wallis (2000) as vacinas vivas são alternativas mais apropriadas, porque podem ser administradas oralmente e são mais efetivas em prevenir a infecção por *Salmonella* spp., por induzir forte resposta imune celular e humoral (sistêmica e local).

Os principais fatores que afetam o sucesso da vacinação estão relacionados a própria vacina, eventos relacionados à administração da vacina, fatores endógenos das aves, condições de manejo e fatores relacionados ao agente etiológico. Dentre os fatores endógenos das aves podemos citar a idade de vacinação, sexo, revacinação, idade de desafio, resistência genética, imunidade passiva e o grau de imunossupressão das aves. As principais causas de imunossupressão das aves são ocasionadas por estresses, doenças intercorrentes e pela ingestão de micotoxinas (BASTOS; CARON, 2016).

As micotoxinas são substâncias químicas resultantes da atividade metabólica de fungos, que podem intoxicar seres humanos e animais. O efeito agudo mais frequente são as alterações de funções hepática e renal, entretanto, algumas micotoxinas agem primariamente, produzindo imunodeficiência (GOMPertz *et al.*, 2005). Entre as micotoxinas que se destacam na contaminação dos grãos de consumo das aves estão: as aflatoxinas, as fumonisinas, os tricotecenos e as ocratoxinas (TESSARI; CARDOSO, 2008).

As aflatoxinas são atualmente as mais estudadas devido aos maiores impactos econômico sobre o desempenho produtivo das aves (COLVERO, 2008). Segundo Giacomini *et al.* (2006), além de comprometer o fígado e rins, outros órgãos como, intestinos, baço, tecidos linfoides também sofrem alterações. Entre os efeitos de imunossupressão demonstrados em aves, destacam-se a aplasia do Timo e da Bursa de Fabricius, redução do número e da atividade das células T, supressão da atividade fagocitária e redução de componentes humorais, como complemento (C4), interferons e imunoglobulinas IgY e IgA.

A avaliação por sorologia e aferição do tamanho de órgãos linfoides, atualmente realizada na avicultura comercial para estimar padrões imunológicos, podem não ter a total capacidade de elucidar o mecanismo das alterações ocasionadas pelos patógenos (MENDONÇA *et al.*, 2009). As avaliações realizadas na maior parte dos estudos voltados à imunofenotipagem de linfócitos aviários estão focadas em amostras do Baço e Timo, havendo alguns poucos estudos sobre as populações celulares circulantes, de mais fácil avaliação (FAIR *et al.*, 2008).

A *Salmonella Gallinarum* (SG) é considerada um patógeno intracelular, sendo que a imunidade celular desempenha um papel importante na imunidade protetora contra infecções

(HOLT *et al.*, 2010). Medir e quantificar células ligadas à imunidade celular, pode não ser uma tarefa simples. A citometria de fluxo é uma técnica que permite analisar o fenótipo celular. Ou seja, o citômetro avalia cada célula individualmente, gravando vários parâmetros sobre a mesma célula. Assim, é permitido identificar e quantificar células T, ligadas à imunidade celular (BEIRÃO, 2011).

Portanto, o objetivo desse estudo é avaliar o comportamento de células ligadas à imunidade celular de aves vacinadas para *Salmonella Gallinarum* e não vacinadas, permitindo quantificar níveis dessas células e também avaliar a influência das aflatoxinas junto ao sistema imune das aves, correlacionando o uso ou não de adsorvente na dieta.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Imunidade das aves

Historicamente a imunidade significa proteção contra doenças, mais especificamente contra doenças infecciosas. As células e moléculas responsáveis pela imunidade constituem o sistema imunológico, e sua resposta coletiva e coordenada à introdução de substâncias estranhas é chamada de resposta imune. No entanto, mesmo as substâncias estranhas não infecciosas podem provocar respostas imunes. Além disso, mecanismos que normalmente protegem os indivíduos da infecção e eliminam substâncias estranhas também são capazes de causar lesões e doenças nos tecidos em algumas situações (ABBAS *et al.*, 2015).

2.2 Órgãos e tecidos linfoides das aves

Embora o sistema imune das aves funcione de maneira semelhante à dos mamíferos, existem diferenças que necessitam ser entendidas mais profundamente (VAINIO; IMHOF, 1995). A estrutura e diferenciação dos órgãos linfoides nas aves apresentam diferenças marcantes quando comparados com os mamíferos (ERF, 2008). Segundo Fellah *et al.* (2008), as aves não possuem linfonodos, apresentando um órgão único, denominado Bursa de Fabricius, localizada na região da cloaca, microambiente ideal para a diferenciação dos linfócitos B. Os linfócitos T diferenciam-se no Timo, órgão formado por dois cordões de sete lobos cada, dispostos paralelamente ao longo das jugulares (CAMPBELL, 2004).

Os tecidos linfoides secundários são o Baço, Tonsilas Cecais e Placas de Peyer localizadas na região do íleo e tecidos linfoides associados às mucosas (MALTs) presentes no proventrículo, trato reprodutivo, pulmões e pele. Também é encontrada uma concentração de tecido linfoide na região oculonasal, denominada glândula de Harderian (CAMPBELL, 2004; ERF, 2008; OLÁH; VERVELDE, 2008).

As células do sistema imunológico das aves dividem-se de acordo com a morfologia nuclear. Os agranulócitos são constituídos por linfócitos, macrófagos, monócitos e trombócitos. Os granulócitos são constituídos por heterófilos, eosinófilos, basófilos e mastócitos. A morfologia dos granulócitos varia de acordo com as espécies aviárias (NORIEGA, 2000).

Em uma ave saudável, há dois sistemas básicos de defesa. Estes sistemas operam constante e simultaneamente, protegendo o animal de agentes infecciosos. Para melhor

compreensão, as respostas imunes são classificadas em imunidade natural e imunidade adquirida ou também denominados mecanismos imunes não-específicos e específicos (TREVISOL, 2006).

2.3 Imunidade natural ou inata

A imunidade inata representa a primeira linha de defesa contra as infecções. Seus mecanismos já se encontram presentes no organismo antes mesmo do encontro com agentes patogênicos e são ativados por estes agentes antes que as respostas imunes adquiridas sejam desenvolvidas (ABBAS *et al.*, 2015).

Segundo Leffer (2004), a imunidade inata é uma resposta inicial que visa impedir a infecção do hospedeiro e que em muitos casos pode eliminar os microrganismos causadores da infecção. A capacidade de determinados microrganismos para causar enfermidades, em geral, está relacionada às estratégias que utilizam para resistir e/ou escapar das respostas imunes inatas.

Além da inflamação ativa e da resposta antiviral a infecções, o sistema imunológico inato inclui defensas físicas e químicas em barreiras epiteliais, como a pele e o revestimento dos tratos gastrointestinais e respiratórios, que funcionam em todos os momentos para bloquear a entrada microbiana (ABBAS *et al.*, 2015).

Para Kaiser (2010), a resposta sistema imune inata tem seus próprios receptores (receptores de reconhecimento de padrões), suas próprias células efetoras (neutrófilos, heterófilos, células “*natural killer*” e células dendríticas), produz citoquinas e quimiocinas que impulsionam as respostas inflamatórias e influenciam na resposta imune adaptativa.

2.3.1 Receptores de reconhecimento de padrões (PRRs)

Os PPRS reconhecem antígenos exógenos e endógenos. De maior relevância para a resposta imune, os PRRs reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs). Estas podem ser moléculas expressas na superfície de agentes patogênicos, tais como lipopolissacarídeo (LPS), ácido lipoteicoico, flagelina e peptidoglicanos, ou ácido nucleico patógeno, incluindo RNA de cadeia simples, RNA de cadeia dupla ou DNA-CpG (KAISER, 2010).

O sistema imune inato também reconhece moléculas endógenas que são produzidas ou liberadas por células danificadas. Essas substâncias são chamadas de padrões moleculares

associados ao dano (DAMPs). Os DAMPs podem ser produzidos como resultado do dano celular causado por infecções, mas também podem indicar danos estéreis às células causadas por uma infinidade de razões, como toxinas químicas, queimaduras, traumatismos ou diminuição do suprimento de sangue (ABBAS *et al.*, 2015).

O sistema imune inato usa vários tipos de receptores localizados em diferentes locais da membrana plasmática, endosomas, citosol de fagócitos, células dendríticas, endoteliais, assim como estruturas solúveis no sangue e secreções de mucosas para reconhecer PAMPs e DAMPs (KOGUT *et al.*, 2005).

Conforme Abbas *et al.* (2015), os principais receptores associados às células estão representados pelos “*Toll-like*” (TLRs), “*NOD-like*” (NLRs), “*RIG-like*” (RLRs), sensores DNA citossólicos (CDSs), “*Lectin-like*” tipo C (CLRs), “*Scavenger*” e receptores N-Formil “Met-leu-phe”. Quando esses receptores de reconhecimento de padrões associados a células se ligam a PAMPs e DAMPs, eles ativam caminhos de transdução de sinal que promovem as funções antimicrobianas e pró-inflamatórias das células em que são expressas. Além disso, existem muitas proteínas presentes no sangue e fluidos extracelulares que reconhecem PAMPs. Essas moléculas solúveis são responsáveis por facilitar a depuração de micróbios do sangue e dos fluidos extracelulares, aumentando a absorção de fagócitos ou ativando a morte extracelular.

2.3.2 Defensinas

As defensinas são peptídeos pequenos, catiônicos e antimicrobianos expressados principalmente em células epiteliais, bem como em alguns leucócitos. São constitutivamente expressas em grânulos de células fagocíticas, como heterófilos para liberação imediata ou são indutíveis em resposta à sinalização de PRRs (KAISER, 2010). Nos mamíferos, existem três classes de defensinas: α -defensinas e β -defensinas são as principais classes, produzidas por todos os mamíferos, com uma classe menor, θ -defensinas, produzida apenas por primatas não humanos. Em aves, pelo contrário, existe apenas a família β -defensina (LYNN *et al.*, 2007).

2.3.3 Células dendríticas

As células dendríticas desempenham funções essenciais de reconhecimento e efetividade na imunidade inata. Trata-se de uma família heterogênea de células com processos

citoplasmáticos longos, que estão presentes nos epitélios e na maioria de tecidos. Devido à localização e morfologia, essas células estão preparadas para detectar micróbios invasores. Além disso, as células dendríticas expressam mais tipos diferentes de TLRs e receptores de reconhecimento de padrões citoplasmáticos do que qualquer outro tipo de célula, tornando-os os sensores mais versáteis de PAMPs e DAMPs entre todos os tipos de células no corpo (ABBAS *et al.*, 2015).

Em mamíferos, após as células dendríticas capturarem e processarem antígenos, ocorre uma migração para o linfonodo de drenagem local e amadurecem para um modo de apresentação de antígeno, perdendo a capacidade de fagocitose e endocitose, mas moléculas co-estimuladoras reguladoras da elevação e tornando-se potentes estimulantes de células T. No entanto, as galinhas, como outras espécies não mamíferas, carecem de linfonodos, e nestas espécies o local da apresentação de antígenos por DCs à resposta imune adaptativa não está totalmente elucidado. (KAISER *et al.*, 2010).

Existe um subconjunto particular de células dendríticas, chamadas células dendríticas plasmocitóides. Essas células possuem morfologia semelhante às células plasmáticas produtoras de anticorpos. Trata-se de uma fonte importante de citocinas antivirais, interferons de tipo I, produzidos em resposta a infecções virais. Essa característica das células dendríticas plasmocitóides deve-se em parte ao fato de que essas células expressam quantidades abundantes de TLRs endossais (TLRs 3, 7, 8, 9), que reconhecem os ácidos nucleicos de vírus que foram internalizados na célula (ABBAS *et al.*, 2015).

2.3.4 Fagócitos

Vários tipos de leucócitos (células brancas do sangue) atacam, fagocitam, destroem e eliminam agentes infecciosos ou partículas que eles reconheçam como estranhas (BALESTIERI, 2005). Para Caron (2008), os fagócitos também desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da imunidade específica, agindo como células apresentadoras de antígenos (APC).

As aves possuem uma distinção quanto às células polimorfonucleares em relação a mamíferos, pois possuem heterófilos, considerados as principais células efetoras de uma resposta imune induzida (BROWNLIE; ALLAN, 2011). Para Kaiser (2010) os heterófilos, equivalentes aos neutrófilos em mamíferos, são considerados os primeiros tipos de células a responder, muitas vezes dentro de uma hora, ao local de uma infecção, particularmente infecções bacterianas, em resposta às quimiocinas.

Depois dos agentes patogênicos serem fagocitados, eles são mortos por uma variedade de mecanismos, desencadeando a explosão respiratória com consequente produção de reativos de oxigênio (NADPH oxidase), assim como, com a liberação de proteínas (cathelocidina, catepsina, mieloperoxidase e defensinas) em grânulos para o interior do fagossomo (CHUAMMITRI *et al.*, 2009).

Outras células importantes são os monócitos, que não fagocitam ativamente, até deixarem a corrente sanguínea e entrarem nos tecidos. Para Calich e Vaz (2001), quando ocorre uma infecção, os monócitos são atraídos para a área da infecção por substâncias químicas liberadas no processo inflamatório. À medida que eles se deslocam para os tecidos, sob a ação de mediadores químicos, eles crescem, amadurecem e se tornam macrófagos.

Os macrófagos são considerados a primeira linha de defesa contra os agentes infecciosos, fagocitando-os quando presentes no sangue e nos tecidos, sendo fundamentais na regulação da resposta imunológica, tanto natural quanto específica (KLASING, 1998).

Os macrófagos são capazes de fagocitar partículas estranhas e destruí-las sem haver necessidade de transcorrer muito tempo após o encontro. Além dessas funções, os macrófagos secretam moléculas que amplificam a resposta imune, controlam a inflamação, contribuem diretamente para o reparo de danos teciduais através da remoção de tecido morto e auxiliam no processo de cicatrização. A molécula responsável por mediar grande parte dessas funções é a interleucina –1 (IL-1) que é secretada pelos macrófagos (QURESHI, 1998).

Nas aves, os trombócitos também são células bastante importantes na resistência imunológica inespecífica, já que estão circulando em grande número no sangue e que, ao contrário das plaquetas dos mamíferos, possuem capacidade de aderir e fagocitar inúmeras partículas estranhas (GRECCHI *et al.*, 1980).

A capacidade fagocitária dos trombócitos, de acordo com a idade das aves, é de 2 a 3 vezes maior do que no caso dos heterófilos e dos monócitos, podendo fagocitar 1,7 vezes mais bactérias que essas células (NORIEGA, 2000).

2.3.5 Inflamação

Para Calich e Vaz (2001), a inflamação é resultado de um dano tecidual causado pelo agente patogênico, facilitando o acesso de células do sistema imunológico e de substâncias ativas (mediadores químicos) a área infectada. Células e mediadores químicos têm um papel fundamental na restrição e no combate ao agente patogênico nesses locais. Esses fatores

também são fundamentais no reparo e na cicatrização do tecido lesado, após a infecção ter sido combatida.

Segundo Morgulis (2002), a reação inflamatória das aves caracteriza-se por um aumento da permeabilidade vascular, confinada às vênulas. A histamina e serotonina 5-HT são mediadores desse aumento da permeabilidade, porém diferente dos mamíferos as bradicininas parecem não ser mediadores importantes no aumento da permeabilidade vascular.

Para Cardoso e Tessari (2003), os tipos celulares encontrados inicialmente durante uma reação inflamatória são os heterófilos e monócitos, seguido por uma migração de basófilos. Os linfócitos aparecem no sítio da lesão mais tardiamente.

Os basófilos encontram-se no sangue periférico e aumentam em processos necróticos, etapas iniciais da inflamação, reações de hipersensibilidade e situações de estresse severo em aves. Seus grânulos de cor violeta contêm heparina e peroxidase (NORIEGA, 2000). Na reação imunológica não são encontrados eosinófilos, indicando que as aves não reagem da mesma forma ao estímulo imunológico que os mamíferos. Possuem mecanismo desintoxicante e são importantes na regulação do processo inflamatório (MORGULIS, 2002).

Os eosinófilos não são propriamente fagócitos e atuam na membrana plasmática da célula infectada por desgranulação, libertam seus grânulos que contêm histaminase que inibe a histamina encontrada nos basófilos e mastócitos, moderando assim as reações de anafilaxia (NORIEGA, 2000).

2.3.6 Células Natural Killer (NK)

Segundo Morgulis (2002), as células NK são subpopulações de linfócitos capazes de matar células tumorais e de mediar a imunidade contra células infectadas por vírus e bactérias intracelulares. Essas células foram bem caracterizadas em mamíferos, mas ainda não se comprovou se as células NK das aves são análogas às das dos mamíferos. No entanto, Sharma (1984) demonstrou que as células NK de galinhas são ativas contra tumores e agentes infecciosos.

Em mamíferos, as células NK constituem de 5% a 15% das células mononucleares no sangue e no baço. Elas são raras em outros órgãos linfóides, mas são abundantes em certos órgãos, como fígado e útero. As células NK no sangue aparecem como linfócitos grandes com numerosos grânulos citoplasmáticos. As células NK não expressam receptores antigênicos distribuídos clonicamente, típicos das células B e T. Em vez disso, elas usam receptores codificados por DNA de linha germinativa para distinguir células infectadas por patógenos de

células saudáveis. Elas podem ser identificados no sangue pela expressão de CD56 e a ausência do marcador de células T CD3 (ABBAS *et al.*, 2015).

2.3.7 Sistema Complemento

Conforme Abbas *et al.* (2005), o sistema complemento é uma série de proteínas plasmáticas cuja ativação ocorre em forma sequencial, como uma cascata, sempre que há lesão de tecidos ou parede de vasos ou alteração dos componentes sanguíneos, presença de microrganismos, ou reação antígeno-anticorpo.

Na via clássica, quando o anticorpo encontra com o antígeno, há a exposição de um sítio ativo da porção constante do anticorpo. Esse sítio ativo liga-se à molécula C1 do sistema complemento, levando a uma série de reações em cascata com a formação de vários elementos com diferentes atividades na imunidade. Um dos produtos liberados é o fragmento C3b que ativa a fagocitose. Outros produtos são capazes de induzir a quimiotaxia, aumentando o número de fagócitos no sítio onde se encontra o antígeno. O sistema complemento também pode ser ativado pela via alternativa, ou seja, sem que haja a ligação antígeno-anticorpo. Algumas grandes moléculas têm a propriedade de se ligar a fatores do complemento e iniciar os mesmos efeitos já descritos (MORGULIS, 2002). Segundo Calich e Vaz (2001), as principais funções resultantes da ativação do complemento são a destruição de células alteradas (ou infectadas), facilitação da fagocitose (opsonização) e retirada de imunocomplexos da circulação.

2.3.8 Interferons

Os interferons (IFNs) são substâncias químicas produzidas por células infectadas por vírus, secretados no meio extracelular, sendo captados por células vizinhas. A captação do IFN por essas células pode conferir a elas um estado de resistência contra o vírus. Os interferons de tipo I mais importantes na defesa viral são IFN- α , que inclui 13 diferentes proteínas intimamente relacionadas, e IFN- β , que é uma proteína única. As células dendríticas plasmocitóides são as principais fontes de IFN- α , mas também podem ser produzidas por fagócitos mononucleares. IFN- β é produzido por diferentes tipos de células (ABBAS *et al.*, 2015).

2.4 Imunidade adquirida ou específica

Quando um organismo animal é exposto a um antígeno estranho, as respostas imunes específicas se desenvolvem. Essa forma de imunidade é denominada imunidade ativa, já que é necessária a ação de diferentes elementos do organismo da ave (MARGULIS, 2002).

No entanto, Abbas *et al.* (2015) relata que é possível desenvolver uma resposta imune específica sem que haja um envolvimento ativo do organismo, através da transferência de células ou de anticorpos de outro indivíduo já imunizado. Esse tipo de imunidade denomina-se imunidade passiva.

Segundo Trevisol (2006), as respostas imunes específicas são classificadas em dois tipos, baseadas nos componentes que participam dessas respostas: a imunidade humoral e a imunidade mediada por células. A imunidade humoral é mediada por células chamadas anticorpos, responsáveis pelo reconhecimento e pela eliminação dos antígenos e que pode ser transferida através do soro ou do plasma de um indivíduo imunizado para outro não imunizado (TIZARD, 1998).

Para Morgulis (2002), a imunidade humoral tem importância fundamental na criação de aves, já que grande parte dos vírus patogênicos para as aves induzem esse tipo de imunidade. Assim é fundamental uma eficiente vacinação nas matrizes, para que haja a produção e a transferência de anticorpos, determinando uma imunidade eficiente nas primeiras semanas de vida dos pintos.

A imunidade mediada por células ou também chamada imunidade celular envolve as células denominadas linfócitos T. A função principal da imunidade mediada por células T é ativar macrófagos para matar agentes intracelulares e induzir respostas inflamatórias robustas, de modo que um exército suficientemente grande de fagócitos é chamado para o local de infecção (KAISER, 2010).

A ativação dos linfócitos requer dois sinais distintos, sendo primeiro o contato direto com o antígeno e o segundo sinal é o contato com moléculas produzidas durante a resposta imune inata junto aos micróbios ou células lesadas (PAMPs e DAMPs). O requisito de antígeno (sinal 1) garante que a resposta imune que se segue é específica. A exigência de estímulos adicionais desencadeados por reações imunes inatas aos micróbios (sinal 2) garante que as respostas imunes adaptativas são induzidas quando existe uma infecção perigosa e não quando os linfócitos reconhecem antígenos inofensivos, incluindo auto antígenos (ABBAS *et al.*, 2015).

2.4.1 Linfócitos

Os linfócitos podem ser divididos em pequenos ou grandes. Os primeiros são subdivididos em linfócitos B e linfócitos T. Os grandes linfócitos são conhecidos como exterminadoras naturais ou NK. Os linfócitos das aves apresentam aproximadamente o mesmo tamanho que os dos mamíferos (TREVISOL, 2006).

Segundo Abbas *et al.* (2015), os linfócitos são produzidos da linhagem linfoide de células de células tronco da medula óssea. São as células responsáveis pelo reconhecimento do antígeno e pela montagem da resposta imunológica. Como há diferentes formas de resposta imunológica, existem também diferentes tipos de linfócitos.

Para Caron (2008), nas aves, a diferença das outras espécies é muito clara pela precocidade na formação e maturação do sistema imune, uma vez que estas células da resposta adaptativa são oriundas de órgãos primários, como o timo e a bursa. A receptividade do timo embrionário, por volta dos 6 dias de incubação, e da bursa, por volta dos dez, permite a formação destes linfócitos, que na vida embrionária são morfologicamente iguais aos de aves pós nascimento, mas que ainda têm funcionalidade limitada.

Existem várias populações e subpopulações de linfócitos, cada qual com características e funções efectoras diferentes. As subpopulações de linfócitos podem ser distinguidas através de seus marcadores (proteínas) de superfície. Por isso, muitas vezes as populações de linfócitos são denominadas pelos marcadores de membrana que os mesmos possuem (CALICH; VAZ, 2001).

2.4.2 Linfócitos T

Os linfócitos T não são capazes de reconhecer o antígeno sozinho. Para haver o reconhecimento, é necessário que esse antígeno seja apresentado pelas células apresentadoras de antígenos (APC) junto com moléculas, na superfície dessas células, produtos do complexo de histocompatibilidade maior (ABBAS *et al.*, 2015).

As moléculas do MHC são de dois tipos nos mamíferos: de classe I e de classe II. Os antígenos MHC de galinhas são glicoproteínas de superfície celular de três classes diferentes: classe I (B-F), classe II (B-L) e classe IV (BG), que são essenciais na regulação das interações célula-célula. Um segundo complexo de histocompatibilidade de genes ocorre no frango, Rfp-Y, composto de genes MHC classe I e classe II. (UMAR *et al.*, 2017).

Para que o linfócito T seja capaz de reconhecer o antígeno apresentado pelas APC, é necessária a presença do chamado receptor de linfócito T (TCR). Composto por proteínas da superfície da célula, o TCR é apenas encontrado em linfócitos T. Esse receptor é capaz de se ligar ao complexo formado pelo antígeno e moléculas do MHC presentes nas células apresentadoras de antígenos (APC). Essa ligação determina uma série de transformações no linfócito T, iniciando a secreção de citocinas, que atuarão em outras células. Para a maioria das respostas para a produção de anticorpos pelas células B, é necessário o auxílio de células T (FERNANDES *et al.*, 2014).

Na ave, o TCR é composto por cadeias α e β ou por cadeia γ e δ , formando dois grandes subgrupos de células de acordo com o TCR: $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$. Outro tipo de marcador celular é denominado determinante celular (CD) e pode ser de diversos tipos. O CD4 está presente em subpopulações de linfócitos T, interagindo com moléculas de MHC classe II, e com funções auxiliares. O CD8 está presente em linfócitos T, interage com moléculas de MHC de classe I, e tem funcionalidade relacionada à citotoxicidade e função supressora (MORGULIS, 2002).

Para Abbas *et al.*, (2015) importante ressaltar que após a ativação e multiplicação, uma parcela de linfócitos T não se diferencia em células efetoras, e permanece como célula de memória, assim como os linfócitos B. São essas células de memória que darão início à resposta imunológica em exposições subseqüentes ao antígeno.

2.4.2.1 Linfócito T auxiliar

Os linfócitos T somente reconhecem antígenos protéicos que são inicialmente fagocitados e processados por células chamadas de células APCs. No organismo, existem apenas um grupo seletivo de células expressa MHC-II e funciona como APC para linfócitos TCD4. Essas células incluem: os macrófagos, células dendríticas, interdigitantes e linfócitos B (CALICH; VAZ, 2001).

Após a fagocitose, as proteínas do agente são processadas no interior do fagócito de determinados compartimentos intracelulares e esses peptídeos associam-se a moléculas do MHC-II. Os complexos MHC-II+peptídeo são transportados à superfície da célula, onde são reconhecidos pelos linfócitos TCD4 através do TCR+CD4. Essa ligação, gera um estímulo para a proliferação dos linfócitos TCD4, com a conseqüente produção de interleucinas que irão coordenar a ação de várias células na resposta imunológica, como a estimulação de macrófagos, linfócitos T citotóxicos e a proliferação e diferenciação de Linfócitos B, conseqüentemente a produção de anticorpos (ABBAS *et al.*, 2015).

Para Morgulis (2002), citocinas são potentes mediadores da resposta imune. São capazes de modular tanto as respostas locais como sistêmicas aos estímulos antigênicos. Porém, em aves, ainda não foram caracterizadas em nível molecular, embora tenha sido descrita inúmeras citocinas aviárias.

Os linfócitos T auxiliares (CD4) no sangue periférico de frangos são em grande parte células com o fenótipo $CD4^+TCRV\beta1^-$ (chamados de Linfócitos T auxiliares periféricos). Estas células são os linfócitos auxiliares clássicos, com função de organizar a resposta imune adaptativa e ativar linfócitos (VIERTLBOECK; GÖBEL, 2008).

Os Linfócitos T CD4 que expressam a molécula TCRV $\beta1$ ($CD4^+TCRV\beta1^+$) têm tendência de migrarem para mucosas, onde são cruciais para a produção de Ig A (CIHAK *et al.* 1991). Outros linfócitos T (não-CD4) também apresentam a molécula TCRV $\beta1$, sendo caracterizados, aqui, pelo fenótipo $CD4^-TCRV\beta1^+$ (denominadas de Linfócitos T citotóxicos de mucosas). Estas células são também importantes para a imunidade de mucosa, entretanto, principalmente com função de imunidade celular, ao invés de humoral (LILLEHOJ, 1994).

2.4.2.2 Linfócito T citotóxico (CLT)

Os linfócitos T citotóxico (CLT) reconhecem proteínas de microrganismos produzidas dentro das células do hospedeiro. Proteínas estranhas produzidas dentro das células durante a replicação de vírus e algumas bactérias intracelulares são inicialmente processadas, originando peptídeos, os quais se associam a moléculas de MHC-I em determinados compartimentos celulares e posteriormente os complexos MHC-I+peptídeos são enviados até a superfície da célula, onde ficam expostos. Todas as células do organismo, com exceção dos neurônios, possuem MHC-I (ABBAS *et al.*, 2015).

Os linfócitos TCD8 reconhecem esses complexos (MHC-I+peptídeo) através de seu TCR+CD8. O estímulo gerado por essa ligação é enviado para o interior do linfócito, sendo responsável por sua ativação e proliferação (KAISER, 2010).

Os linfócitos TCD8 ativados tornam-se citotóxicos e destroem as células infectadas. O CTL, em contato com a célula infectada, libera no meio extracelular substâncias denominadas de perforinas. Essas perforinas produzem poros (aberturas) na membrana plasmática da célula alvo. Com isso, ocorre influxo de água para o interior celular, levando à morte celular por lise osmótica ou pela entrada de substâncias granulares (CALICH; VAZ, 2001).

Os linfócitos T citotóxicos (CD8) podem ser subdivididos de acordo com a expressão da molécula co-estimulatória CD28 em sua superfície. Linfócitos T citotóxicos virgens, células

de memória ou linfócitos em estado inicial de ativação apresentam o fenótipo $CD8^+CD28^+$, denominados aqui de Linfócitos T citotóxicos. Outros linfócitos T também apresentam a molécula CD28 na sua superfície, sendo caracterizados pelo fenótipo $CD8^-CD28^+$, sendo denominados aqui de Linfócitos T auxiliares (NABESHIMA *et al.*, 2002).

Linfócitos T CD8 que passaram por processo prolongado de ativação perdem a expressão da molécula co-estimulatória CD28, sendo, portanto, caracterizados pelo fenótipo $CD8^+CD28^-$, denominados no presente estudo como Linfócitos T citotóxicos ativados. Estas células são terminalmente ativadas, sendo estritamente específicas para o antígeno-alvo, sendo também incapazes de se replicarem (PAWELEC *et al.*, 2004).

2.4.3 Linfócitos B

O reconhecimento do antígeno pelos linfócitos B e T se faz de maneiras diferentes. Os linfócitos B reconhecem os antígenos na sua conformação natural, utilizando moléculas de imunoglobulinas de alta especificidade, principalmente IgM, expressas em sua superfície. Esse mecanismo é importante para o reconhecimento de patógenos extracelulares, como bactérias e vírus livres, além de proteínas e outros antígenos não proteicos (ABBAS *et al.*, 20015).

Os linfócitos B são responsáveis pela imunidade humoral. A ligação específica BCR-antígeno gera sinais intracelulares que levam à proliferação dos linfócitos e, eventualmente, à geração de plasmócitos produtores de anticorpos específicos para o antígeno que os estimulou (TIZARD, 1998).

Segundo Calich e Vaz (2001), antígenos proteicos não induzem a formação de anticorpos sem a participação de TCD4. A proliferação de linfócitos B para originar plasmócitos secretores de anticorpos para um antígeno proteico depende, além da ligação específica BCR-antígeno, das interleucinas geradas pelos linfócitos TCD4.

Algumas das células específicas que proliferaram em resposta ao antígeno não se diferenciam em plasmócitos, permanecendo no centro germinativo. Essas células constituem as células de memória. Diante de uma reexposição ao mesmo antígeno, as células de memória irão responder mais rápida e eficientemente, pois grande parte dos processos de reconhecimento, ativação e proliferação já ocorreram durante a resposta inicial (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Segundo Morgulis (2002), as aves possuem anticorpos do tipo IgY, IgM e IgA. O anticorpo IgY, embora com características estruturais próprias, é comumente chamado de Ig G. Da mesma forma que em IgG, a IgY é uma molécula de baixo peso molecular, sendo aquela

encontrada em maior quantidade no soro e é o maior mecanismo de defesa contra infecções sistêmicas, sendo também capaz de mediar reações anafiláticas.

Nas mucosas, primeiro sítio de desafio antigênico, existe uma grande concentração de IgA. Em nível sérico, a ave ainda apresenta a IgM, o primeiro anticorpo presente após um desafio, e a IgY que é detectada posteriormente, sendo mais específica (CARON, 2008).

A grande geração de anticorpos diferentes é feita por meio de conversão gênica. Essa descoberta revelou que não apenas a Bursa de Fabricius é um sítio para a diferenciação dos linfócitos B, mas que também é um órgão que permite a ocorrência da conversão gênica (DIETERT; LAMONT, 1994).

Os anticorpos ligam-se diretamente ao antígeno ou ativam o sistema complemento. Ao se ligarem diretamente ao antígeno, os anticorpos podem fazer com que haja aglutinação de partículas grandes formando um aglomerado (ABBAS *et al.*, 2015).

Para Morgulis (2002), os anticorpos podem também fazer com que haja precipitação do complexo antígeno-anticorpo formando um composto insolúvel. O anticorpo também pode se ligar a porções importantes do antígeno, fazendo com que esse perca sua patogenicidade. No entanto, a mais importante é a ligação do anticorpo com o antígeno, facilitando o englobamento pelos fagócitos, já que esses possuem receptores para a porção constante do anticorpo. Da mesma forma, ao se ligarem às células, os anticorpos podem causar a ruptura e promover a lise celular, eliminando células que apresentem antígenos reconhecidos.

2.5 Tifo Aviário

O agente do tifo aviário é a *Salmonella enterica* subespécie enterica, sorovar Gallinarum. A bactéria *Salmonella Gallinarum* (SG) é um biovar hospedeiro-específico que causa uma grave infecção sistêmica nas aves (FREITAS NETO *et al.*, 2013). A infecção por SG leva ao desenvolvimento de um quadro severo com sintomatologia aparente. As aves tornam-se apáticas e enfraquecidas, as fezes possuem cor amarelo-esverdeadas e a multiplicação da bactéria nos órgãos internos causa esplenomegalia e hepatomegalia. As taxas de morbidade e mortalidade são altas, podendo acometer 80% das aves em lotes positivos (BERCHIERI JÚNIOR *et al.*, 2001).

No Brasil tem sido diagnosticada em áreas de exploração de aves de postura comercial, mas também pode ocorrer em aves reprodutoras (pesadas e leves). Devido a severidade da enfermidade e o impacto econômico causado ao setor avícola, o Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) vinculado ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA)

exige o sacrifício de todos os lotes de reprodutoras comerciais positivas para SG. É importante salientar que o tifo aviário em décadas passadas já esteve em estágio controlado junto a avicultura de postura. Esse “status” sanitário foi alcançado principalmente devido as monitorias oficiais sanitárias realizadas não somente em reprodutoras, mas também aplicadas em poedeiras comerciais (BERCHIERI JÚNIOR *et al.*, 2001; ESTUPIÑAN, 2016).

A transmissão de SG ocorre primeiramente por via horizontal. No entanto, alguns pesquisadores consideram a possibilidade de transmissão pela via vertical (POMEROY; NAGARAJA, 1991). As infecções por SG geralmente não causam comprometimento intestinal como notado em quadros de infecção de salmoneloses paratíficas (WYANT *et al.*, 1999). O contato de aves sadias com aves doentes, carcaças de aves mortas por SG e o canibalismo estão entre os principais facilitadores de disseminação do agente etiológico do tifo aviário em granjas (BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009).

A maioria dos sorovares de *Salmonella* invade o organismo na região entérica, atingindo o íleo distal e o ceco, replicando-se na submucosa e nas placas de Peyer (KAISER *et al.*, 2000; JONES *et al.*, 2001). Embora SG não seja um bom colonizador, provavelmente, devido à ausência de flagelos, consegue invadir os enterócitos, penetrando no epitélio intestinal ou no tecido linfóide, localizado nas placas de Peyer e nas tonsilas cecais (CHAPPELL *et al.*, 2009; BARROW; FREITAS NETO, 2011; SETTA *et al.*, 2012). A SG é fagocitada por leucócitos, principalmente heterófilos e macrófagos residentes (CHAPPELL *et al.*, 2009).

A bactéria invade e sobrevive dentro de células do sistema imune do hospedeiro, os macrófagos são as principais células infectadas. Os fagócitos contendo a bactéria atingem a circulação linfática e migram dos tecidos epiteliais para órgãos como baço, fígado, ovário e pulmões das aves, atuando como transportadores de SG (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009). A SG induz resposta inflamatória de menor intensidade no intestino, favorecendo o desencadeamento de doença sistêmica severa (KAISER *et al.*, 2000). Durante a fase aguda da infecção, ocorre acelerada multiplicação da SG no sistema fagocítico mononuclear (SMF), produzindo uma reação anafilática de hipersensibilidade, provocando sintomatologia e morte (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

De acordo com Shivaprasad (2000), o tifo aviário é uma enfermidade com características de septicemia e toxemia. Observa-se congestão dos órgãos internos e anemia provocada pela destruição de hemácias pelo sistema retículo-endotelial. Nos quadros agudos, as alterações não são proeminentes. Nesses casos, o fígado e o baço aumentam de 3 a 4 vezes de tamanho.

Para Berchieri e Freitas Neto (2009), o fígado torna-se friável, esverdeado, amarelo-esverdeado a bronzeado e apresenta pontos necróticos (esbranquiçados) e hemorrágicos. A vesícula biliar estará distendida em função do aumento de volume de bile. Os pontos necróticos aparecem no baço e no coração.

De acordo com Shivaprasad e Barrow (2008), nos casos em que o curso da enfermidade é mais longo, pode se observar hidropericárdio e também a presença de processos inflamatórios formando nódulos esbranquiçados, semelhantes aos descritos na Pulorose, no coração, baço, pulmões, moela, pâncreas, duodeno e cecos. O processo inflamatório no coração poderá atingir o pericárdio que se tornará opaco, assim como o líquido do saco pericárdico. Os rins poderão estar amarelados e o ovário atrofiado ou com os folículos ovarianos hemorrágicos, congestos, císticos, disformes, contendo material caseoso ou hemorrágico no seu interior, assim como ocorre na Pulorose.

Segundo Oliveira *et al.* (2005), o diagnóstico definitivo compreende o isolamento e a identificação do agente. O procedimento bacteriológico é o mesmo adotado para *Salmonella Pullorum*. O comportamento destas duas salmonelas é similar. Porém, podem se diferir bioquimicamente (SG fermenta dulcitol enquanto SP não; SP descarboxila a ornitina e SG não).

A utilização de antibióticos pode amenizar o problema. Porém, como a enfermidade é mais comum em aves adultas, a mortalidade pode persistir por períodos prolongados, sendo preciso tomar cuidado para não intoxicar as aves com a administração prolongada de antimicrobianos. O maior aliado no controle do tifo aviário é a adoção de medidas de profiláticas. As principais ações para prevenção do tifo aviário estão ligadas a monitorias sorológicas dos pintaninhos na entrada da granja, princípios de biossegurança e adoção de um programa vacinal (BERCHIERI JUNIOR; FREITAS NETO, 2009).

A imunização é importante para a proteção das aves em qualquer fase do ciclo de produção. Atualmente, estão disponíveis vacinas preparadas com estirpes vivas e inativadas (bacterinas) para controle de SG. As vacinas vivas são preparadas com estirpes atenuadas de SG, como SG9R, e as vacinas inativadas, também conhecidas como bacterinas comerciais, são preparadas com células mortas inativadas ou subunidades imunogênicas da bactéria (ZANCAN, 2013).

Nas vacinas inativadas, as bacterinas preparadas com antígenos de SG para prevenir o tifo aviário são pouco utilizadas no Brasil. Estas vacinas induzem uma elevada produção de anticorpos, mas a imunidade celular é pouco estimulada. A proteção conferida por vacinas inativadas é menor e a aplicação é realizada de forma individual na musculatura peitoral da ave, acarretando em aumento do custo com mão-de-obra e equipamentos de vacinação. Além disso,

os adjuvantes utilizados podem provocar forte reação inflamatória no local quando aplicados em condições inadequadas (CARDOSO; ROCHA, 2006).

A presença de aglutininas não significa proteção. Embora os anticorpos participem do combate a SG, o sucesso dependerá, principalmente, da imunidade celular. Em virtude dessa informação, as vacinas vivas são melhores imunógenos, pois induzem o desenvolvimento da resposta imune celular, além de possuírem muitos antígenos similares aos epítomos presentes em estirpes patogênicas (BARROW; WALLIS, 2000; DÍAZ, 2014).

A imunidade contra SG envolve o deslocamento de células $CD4^+$ e $CD8^+$ para o local da infecção e conseqüente redução na quantidade circulante desses subtipos (ASHEG *et al.*, 2003, BARUA; YOSHIMURA, 2004). A defesa envolve linfócitos T dos três tipos de receptor TCR ($\gamma\delta$, $\alpha\beta V\beta1$ e $\alpha\beta V\beta2$). As células TCRV $\beta1$ expressam menores quantidade de CD28 do que as células TCRV $\beta2$, indicando menor grau de ativação destas. Ambos os TCR $\alpha\beta$ podem expressar em sua superfície CD4 simultaneamente com CD8 $\alpha\alpha$. Após a imunização, um aumento na quantidade circulante de TCR está associado à montagem de resposta protetora e efetiva proteção quando submetido ao desafio. Todavia, respostas distintas podem ser observadas entre a imunização e o desafio (BERNDT *et al.*, 2006).

2.6 Aflatoxinas

Conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS), a aflatoxina (B1) é classificada como carcinógenos do grupo 1 e considerada um dos mais potentes carcinógenos naturais conhecidos (IARC, 2002). O crescimento fúngico e a conseqüente produção das aflatoxinas podem ocorrer em diversas fases do desenvolvimento, maturação, colheita, transporte, processamento e armazenamento dos cereais (MALLMANN *et al.*, 2014).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da RDC nº 7, dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos (BRASIL, 2011). Conforme Brasil (1988), o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Portaria nº 7, estabelecia nível máximo de tolerância de 50 ppb (50 μ g/kg) para as aflatoxinas (somatória de B1 + B2 + G1 + G2) sendo válido para qualquer matéria prima utilizada como ingrediente para rações destinadas ao consumo animal. No entanto, essa portaria foi revogada, não havendo hoje, nenhum nível máximo de tolerância de aflatoxinas estabelecido e fiscalizado pelo MAPA.

Pesquisas conduzidas nos últimos 10 anos pelo Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC), as quais totalizam mais de 400 mil análises em amostras de milho

e ração provenientes de todo Brasil, evidenciam uma ocorrência de 44% de aflatoxinas em amostras de milho e 39% em amostras de ração (MALLMANN *et al.*, 2016).

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (MALLMANN; DILKIN, 2007). São conhecidas, atualmente, 18 compostos similares designados pelo termo aflatoxina, porém os de interesse médico-sanitário são identificados como B1, B2, G1 e G2 (COULOMBE, 1991).

Conforme Tessari e Cardoso (2012), as aflatoxinas são bisfuranocuma derivadas de um decacetídeo, pela via biossintética dos policetídeos, na qual a unidade C2 é perdida durante a formação dos anéis bisfuranos. As aflatoxinas B apresentam anel ciclopentanona na molécula, enquanto que as da série G possuem anel lactona. As aflatoxinas B2 e G2 são dihidroderivados de B1 e G1, respectivamente. Para Smith e Ross (1991), aflatoxinas B (“blue”) e G (“green”) foram assim classificadas devido às fluorescências azul e verde, respectivamente, que emitem quando expostas à luz ultravioleta (UV) de ondas longas.

As aflatoxinas são absorvidas no trato gastrointestinal e biotransformadas primariamente no fígado, por enzimas microssomais do sistema de funções oxidases mistas (BIEHL; BUCK, 1987). De acordo com Ramos e Hernandez (1996), a absorção de aflatoxinas ocorre por difusão passiva através do intestino, difundindo-se rapidamente por todo o organismo de maneira que três horas após a alimentação, aflatoxinas B1 e B2 podem ser encontradas em todos os tecidos, principalmente na moela e fígado. Em estudos com frangos de corte inoculados diretamente no inglúvio (360 mg de aflatoxina B1 - dose única) foi possível isolar aflatoxina B1 em 46,6% dos fígados amostrados em apenas duas horas após o desafio (SALLE *et al.*, 2002).

Depois de depositada no fígado, as aflatoxinas são biotransformadas pelo sistema microssomal hepático em metabólitos tóxicos. Estes metabólitos reativos têm a habilidade de ligar-se de forma covalente com constituintes intracelulares, incluindo DNA e RNA. No núcleo do hepatócito ocorre a inibição da enzima RNA-polimerase, conseqüentemente reduzindo a síntese proteica (WYATT, 1991).

A síntese hepática de gorduras, bem como seu transporte para outras áreas do organismo, é seriamente afetada (MERKLEY *et al.*, 1987). A cor desse órgão varia de normal a amarelo pálido, podendo verificar-se o aparecimento de petéquias e grandes áreas hemorrágicas. Ocorre uma infiltração gordurosa no fígado, o grau de infiltração depende da dose e do tempo de intoxicação por aflatoxina, chegando a 68% de aumento em frangos de corte (SANTURIO, 1999).

Os efeitos tóxicos das aflatoxinas dependem da dose e do tempo de exposição, determinando assim intoxicações agudas ou crônicas. A síndrome tóxica aguda ocorre pela ingestão de alimento com altas concentrações de aflatoxinas, e os efeitos são observados rapidamente. O animal apresenta perda de apetite, hepatite aguda, icterícia, hemorragias e morte (OSWEILER, 1990).

Os efeitos primários da aflatoxicose em aves podem ser utilizados como guia para diagnóstico clínico da doença. A primeira mudança é o aumento no tamanho dos órgãos internos como fígado, baço e rins. Por outro lado, a “Búrsa de Fabricius” e o timo diminuem de tamanho. Na síndrome crônica, o sinal mais evidente é a diminuição da taxa de crescimento dos animais jovens (LEESON *et al.*, 1995).

Na avicultura industrial, rações contaminadas, mesmo com doses inferiores a 75 ppb de aflatoxinas, causam reduções de até 10% no peso das aves (LAZZARI, 1997). De acordo com Tessari *et al.* (2004), níveis a partir de 50 ppb de AFB1 causam uma redução no ganho de peso corpóreo de frangos de corte ao final do experimento. Um dos principais efeitos dessas toxinas é a inibição da síntese proteica, causando assim uma queda no nível de proteínas plasmáticas, principalmente α e β globulinas e albuminas (SANTIN, 2000). No entanto, para que ocorra uma mortalidade alta exclusivamente em função das aflatoxinas são necessárias concentrações maiores. De acordo com Araújo *et al.* (2004), em experimento realizado com quatro linhagens comerciais de frangos de cortes, a DL_{50} foi de 10,32 ppm de aflatoxina B1.

Atualmente, entre todos os efeitos tóxicos causados pelas aflatoxinas, a supressão do sistema imunológico tem sido relevante. Apesar de existir um consenso sobre a imunotoxicidade, seu mecanismo de ação ainda não está bem elucidado. Assim sendo, a imunidade mais afetada é a celular e a aflatoxinas B1 afeta mais os linfócitos T, incluindo tanto as células celulares T auxiliares quanto as T supressoras (MALLMANN *et al.* 2016).

Para Corrier (1991), sensibilidade do sistema imunológico para a imunossupressão induzida pela aflatoxina pode ser manifestada pela depressão da atividade dos linfócitos T ou B e do comprometimento da função efetora dos macrófagos. Conforme Pier, (1992), as aflatoxinas estão diretamente ligadas a plasia do timo, da Bursa de Fabricius, redução do número e da atividade de células T, supressão da atividade fagocitária e redução de componentes do sistema complemento (C4), interferons e imunoglobulinas IgG e IgA.

Mesmo com tantos prejuízos evidenciados pela literatura científica, um correto gerenciamento das micotoxinas pode amenizar drasticamente essas perdas. Ou seja, um bom procedimento de amostragem das matérias primas e rações, assim como a escolha de laboratórios que utilizem metodologias aceitas pela comunidade científica, juntamente com a

escolha de aditivos antimicotoxinas eficazes, são as principais ferramentas para um gerenciamento junto as aflatoxinas (MALLMANN *et al.*, 2016).

Novos estudos estão sendo realizados para auxiliar ainda mais no controle de micotoxinas. Conforme estudos realizados por Andrade *et al.* (2018), através de péptidos sintetizados que imitam epitopos de aflatoxinas na superfícies de fagos, foi capaz de induzir anticorpos específicos contra aflatoxinas B1 em comundongos, tornando essa técnica uma possível ferramenta para o desenvolvimento de futuras vacinas contra as micotoxinas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o comportamento de células do sistema imune junto a vacina SG9R (*Salmonella Gallinarum*), correlacionando a intoxicação de aflatoxinas em poedeiras comerciais com e sem adsorvente na dieta.

3.2 Objetivos específicos

- a) Verificar, através da citometria de fluxo, a concentração de células imune de aves vacinadas (SG9R) e não vacinadas.
- b) Identificar quais serão as células estimuladas pela vacina.
- c) Quantificar o impacto causado pelas aflatoxinas junto as células imune.
- d) Quantificar a interferência das aflatoxinas junto a resposta imune celular das aves vacinadas.
- e) Verificar se a utilização de um aditivo antimicotoxinas (AAM) pode minimizar os danos às células imunes ocasionados pela intoxicação por aflatoxinas nas aves.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local do experimento

O experimento foi realizado no laboratório Imunova da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Conforme Anexo 1, os procedimentos foram aprovados no comitê de ética no uso animais (CEVA) da própria UFPR (Certificado número 031/2017).

4.2 Aves utilizadas

Foram utilizadas poedeiras comerciais de genética Hendrix[®], linhagem ISA- Brown[®] alojadas com 1 dia de idade. As aves foram separadas em 8 tratamentos, utilizando 30 aves por tratamento, totalizando 240 aves. Todas as aves utilizadas no experimento estavam negativas para salmonela.

4.3 Alojamento

As aves foram alojadas em sistemas de isoladores, conforme a Figura 1. Esse formato previne qualquer tipo de contaminação cruzada entre os tratamentos. Cada isolador possui uma área interna de 1,2 m². Conforme o Anexo 2, todos os isoladores foram regulados para obter condições de temperatura e umidade de acordo com orientações técnicas da linhagem genética da ave nas respectivas idades, baseando-se em ISA (2014).

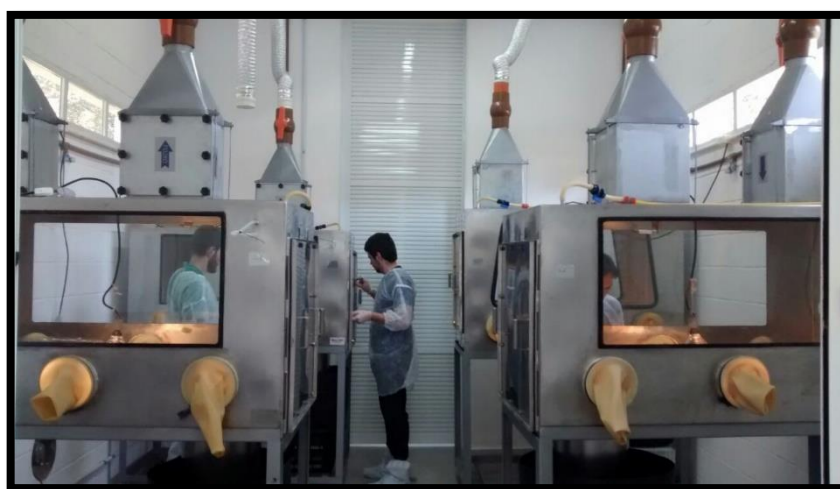


Figura 1 – Sistemas de Isoladores.

4.4 Alimento

Durante todo o experimento, as aves tiveram livre acesso à ração e a água “*ad libitum*”. Conforme o Anexo 3, a ração fornecida obedeceu ao padrão nutricional destinado a linhagem de acordo com Instituto de Seleção Animal (ISA). Não foram adicionados aditivos antibacterianos, simbióticos e acidificantes na ração. Todos os grupos de aves receberam a mesma base nutricional desde o primeiro dia até o final do experimento com 49 dias de idade.

Previamente ao início do experimento, a ração basal foi amostrada e analisada para *Salmonella* spp., conforme a ISO 6579 (2002). Também foram enviadas para o Instituto SAMITEC amostras de ração de todos os tratamentos para análises de micotoxinas, através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (HPLC-MS/MS).

4.5 Análises Complementares (Comprovação de Intoxicação)

Com objetivo de comprovar que as aves desafiadas com aflatoxinas estavam realmente intoxicadas, foram coletados fígados e enviados para o laboratório de patologia aviária da UFPR para análises histopatológicas. Os fígados enviados foram semente do tratamento 5 (apenas aves intoxicadas). No entanto, foram analisados macroscopicamente os fígados de todos os tratamentos. Os pesos das aves também foram aferidos, conforme a Tabela 1.

4.6 Desenho Experimental

O desenho experimental foi realizado baseado em três diferentes investigações junto ao sistema imune das aves: o comportamento celular do sistema imune junto utilização da vacina SG-9R, o desafio com aflatoxinas e a inclusão de um aditivo protetivo antimicotoxinas. Os oito tratamentos estão dispostos em diferentes combinações frente a essas três investigações, conforme a Tabela 2.

Tabela 1 - Atividades desenvolvidas

Dias	Atividades
1	Pesagem e alojamento das aves
28	Vacinação dos tratamentos 2, 3, 4, 7 e 8
31	Pesagem e coleta de Sangue
41	Pesagem e coleta de Sangue
49	Coleta de sangue e eutanásia das aves

4.7 Cronograma de atividades

O experimento teve duração de 49 dias. As aves foram alojadas com 1 dia de idade. A aplicação da vacina SG-9R foi aos 28 dias de idade. Conforme Tabela 2, as coletas de sangue aconteceram com 3, 14 e 21 dias depois da aplicação da vacina, respectivamente com 31, 42 e 49 dias de idade das aves.

Tabela 2 - Desenho Experimental

Tratamentos	Vacina SG9R	Aflatoxinas	Adsorvente
T1	-	-	-
T2	Com 9R	2,5 ppm	2,5 kg/ton
T3	Com 9R	-	-
T4	Com 9R	2,5 ppm	-
T5	-	2,5 ppm	-
T6	-	2,5 ppm	2,5 kg/ton
T7	Com 9R	1 ppm	-
T8	Com 9R	1ppm	1 kg/ton

4.8 Vacinação

Foi utilizado uma suspensão bacteriana liofilizada de *Salmonella Gallinarum* Cepa 9R (CEVACS®), em uma dose reconstituída da vacina de 0,2 ml por ave. A aplicação foi realizada via subcutânea, na região dorsal do pescoço.

4.9 Aflatoxinas

As aflatoxinas foram adquiridas junto ao Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Conforme, Dilkin *et al.* (1998), a técnica trata-se de uma adaptação dos procedimentos preconizados por Pitt (1992). Em resumo, foram inoculados junto a um substrato de arroz, esporos de *Aspergillus parasiticus* linhagem NRRL 2999. Posteriormente, essas amostras foram submetidas a intensas mudanças de temperaturas e umidade, proporcionando condições favoráveis para que o fungo produza as aflatoxinas. Os resultados de quantificação das aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2) no substrato foi realizado por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (HPLC-MS/MS). As aves onde ocorreu o desafio (tratamentos 2,4,5,6,7 e 8) consumiram AFLA durante todo o experimento, desde o primeiro dia. A concentração utilizada nos tratamentos 2,4,5 e 6 foi de 2,5 ppm e nos tratamentos 7 e 8 foi de 1 ppm de AFLA.

4.10 Aditivo antimicotoxinas

O adsorvente utilizado foi a base de aluminossilicato ativado (Mycoad[®]), a dose utilizada nas dietas foi de 2,5 kg de produto por tonelada nos tratamentos 2 e 6 e de 1 kg por tonelada no tratamento 8.

4.11 Coleta de sangue

A coleta de sangue das aves foi realizada com seringa e agulhas estéreis, através da punção da veia ulnar cutânea (asa). Após a coleta (5 ml), o sangue era então colocado em tubo contendo anticoagulante. Os anticoagulantes usados no presente trabalho foram heparina, EDTA e citrato de sódio. Foram amostradas 24 aves por tratamento.

4.12 Isolamento das células mononucleares

As células mononucleares foram separadas do sangue total através de separação por gradiente de densidade utilizando Ficoll (Histopaque-1077[®] - SigmaAldrich), de acordo com protocolo já estabelecido (FAIR *et al.*, 2008). Em síntese, o sangue foi diluído 1:1 em PBS (tampão salino tamponado de fosfato - *phosphate buffered saline*, pH 7,4) para um volume final de 2 mL. Essa diluição foi colocada por cima de 1 ml de Histopaque-1077 em um tubo de 15

mL. As amostras foram centrifugadas em centrífuga *Eppendorf* a 400xg, por 30 minutos a temperatura ambiente.

O sedimento (*buffy coat*) resultante de células brancas acima dos eritrócitos foi então coletado e transferido para outro tubo de 15 mL. As células devem ser lavadas duas vezes com 4 mL de PBS e centrifugadas a 400xg por 7 minutos. O sedimento final foi ressuscitado em 1 mL de PBS para a fixação das células.

4.13 Marcação para análise por citometria de fluxo

A marcação única, dupla ou tripula foi realizada utilizando reagentes marcadores específicos (anticorpos) que se fixam na parede celular das células imunes. Todos os anticorpos foram diluídos em PBS na proporção de 1:10 (1 μ L de anticorpo + 9 μ L de PBS). Posteriormente, essa diluição foi então misturada com 50 μ L das células isoladas em PBS e mantida à temperatura ambiente no escuro por 30 minutos para marcação. Após esse tempo, foi pipetado em todas as amostras uma solução com 2,3% de Paraformaldeído (PFA) e as amostras foram incubadas por mais 30 minutos em uma temperatura a 4 °C.

Após período de incubação, o sedimento final foi ressuscitado em 200 μ l de PBS com BSA 1% e armazenado pelo tempo no mínimo 24 horas em temperatura de 4°C. Após esses procedimentos, todas as amostras foram submetidas para leitura do citômetro.

4.14 Reagentes e células avaliadas

Conforme a Tabela 3, os reagentes utilizados para a detecção das células foram anticorpos da marca Southern Biotech[®]. O reagente para avaliação da fagocitose é da empresa Thermo Scientific[®].

4.15 Citometria de Fluxo

Todas as amostras passaram por citometria dentro de 4 horas após a marcação. A citometria de fluxo foi realizada em um citômetro de fluxo FACSCalibur[®] (Becton Dickinson). Fluorescência verde (fluorescência de FITC) foi detectada no canal FL1 (nm 530/30), e fluorescência laranja (de PE) foi detectada no canal FL2 (nm 585/42). As células foram analisadas em pelo menos 10.000 eventos no *gate* de linfócitos (com base na dispersão frontal e lateral (FSC e SSC), o que inclui trombócitos contaminantes, de morfologia muito semelhante

aos linfócitos (BOHLS *et al.*, 2006). Os dados foram analisados com o software FlowJo® (*TreeStar*) ou WinMDI 2.9 (*Joseph Trotter*).

Tabela 3 - Reagentes utilizados para a detecção de parâmetros imunes.

Células	Reagentes
Linfócitos T auxiliares periféricos (CD4+TCR $\nu\beta$ 1-)	CD4/TCR $\nu\beta$ 1/CD45
Linfócitos T auxiliares de mucosas (CD4+TCR $\nu\beta$ 1+)	CD4/TCR $\nu\beta$ 1/CD45
Linfócitos T citotóxicos de mucosas (CD4-TCR $\nu\beta$ 1+)	CD4/TCR $\nu\beta$ 1/CD45
Linfócitos T citotóxicos ativados (CD8+CD28-)	CD8 α /CD28/CD45
Monócitos (Kul+MHCII+)	Kul-1/MHCII/CD45
Linfócitos B (Bu-1a+)	Bu-1/CD45
Monócitos fagocíticos (%)	Reagente pHrodo
Heterófilos fagocíticos (%)	Reagente pHrodo

4.16 Análise estatística

A média das concentrações das células e dos pesos das aves foram submetidos a uma análise estatística descritiva, utilizando uma análise de variância (ANOVA) pelo método de Fisher PLSD ($P < 0,05$) para a comparação das médias de todos os grupos entre si. O programa estatístico utilizado foi StatView® (SAS Institute, Inc). Os gráficos foram gerados utilizando o programa GraphPad Prism® 6 (GraphPad Software, Inc.).

5 RESULTADOS

5.1 Resultados complementares

5.1.1 Análises de micotoxinas na ração

Conforme Tabela 4, a ração utilizada na dieta das aves não apresentou concentração de outras micotoxinas detectáveis por HPLC-MS/MS. Essa baixa concentração pode ser observada nos tratamentos sem adição experimental de aflatoxinas (T1 e T3). Posteriormente, a inclusão experimental de 2,5 ppm (T2, T4, T5 e T6) e 1 ppm (T7 e T8) elevou a concentração de AFLA dos tratamentos para a concentração desejada do experimento, contemplando o somatório de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.

Tabela 4 – Concentração de micotoxinas na dieta das aves.

Tratamentos	Resultados de Micotoxinas µg/kg (ppb)							
	AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	FB1	FB2	DON	ZEA
T1	2,9	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
T2	2153,8	159,7	199,7	4,8	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
T3	2,9	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
T4	2196,7	155	194,1	14,2	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
T5	2150	174	236,56	5,6	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
T6	2184	162	210	5	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
T7	871,2	63,3	75,9	1,6	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
T8	877	56	70,4	1,63	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

AF = Aflatoxina; F = Fumonisina; DON = desoxinivalenol; ZEA = Zearalenona.

HPLC-MS/MS (Limite de Quantificação - Coeficiente de Recuperação): AFB1 (1 µg/kg-102%), AFB2 (1 µg/kg-92%), AFG1 (1 µg/kg-97%), AFG2 (1µg/kg-92%), FB1 (125 µg/kg-101%), FB2 (125 µg/kg-96%), DON (200 µg/kg-99%), ZEA (20µg/kg-85%).

5.1.2 Presença de *Salmonella* spp.

Todas as amostras de ração foram negativas para presença de *Salmonella* spp. na ração das aves.

5.1.3 Peso das aves

A utilização da vacina não determinou diferença no peso das aves. Essa constatação

pode ser observada quando comparamos aves controle (T1) com aves somente vacinadas (T3) em todas as pesagens (Tabela 5).

Conforme a Tabela 5, é observado uma redução no peso das aves somente intoxicadas (T5) quando comparamos com aves controle (T1), apresentando diferença estatística nas pesagens de 31 e 42 dias. As aves vacinadas e intoxicadas (T4) também apresentaram pesos significativamente menores que aves vacinadas somente (T3). O aumento no desafio de intoxicação de 1ppm para 2,5 ppm também alterou significativamente os pesos das aves vacinadas. Essa diferença pode ser observada quando comparamos aves vacinadas e intoxicadas com 2,5 ppm de aflatoxinas (T4) com aves vacinadas e intoxicadas com 1 ppm de aflatoxinas (T7).

Os tratamentos que tiveram a inclusão do adsorvente na dieta apresentaram um peso significativamente maior comparado com aves intoxicadas. Esse aumento pode ser observado quando comparamos aves intoxicadas com adsorvente na dieta (T6) com aves somente intoxicadas (T5). O aumento no ganho de peso também é observado quando comparamos aves vacinadas e intoxicadas (T4 e T7), com aves vacinadas e intoxicadas com adsorvente na dieta (T8 e T2). Destacando que no tratamento 8, a inclusão na dieta de adsorvente é de 1kg por tonelada com desafio de 1 ppm de aflatoxinas e no tratamento 2 a inclusão é de 2,5 kg de adsorvente por tonelada e desafio com 2,5 ppm de aflatoxinas.

Tabela 5 – Peso das Aves.

Peso das Aves (g)								
Idade	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
1 dia	42,2 ^a	42,84 ^a	41,3 ^a	41,87 ^a	41,07 ^a	43,39 ^a	44,01 ^a	42,95 ^a
31 dias	415,7 ^a	316,6 ^b	371,7 ^a	221,8 ^c	270,7 ^c	338,3 ^b	369,7 ^b	412,8 ^a
42 dias	505,1 ^a	444,7 ^a	483,2 ^a	322,2 ^b	360,7 ^b	422,5 ^b	452,3 ^a	481,5 ^a

A estatística foi realizada separada em cada coleta, comparando todos tratamentos entre si. As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de teste de Fisher PLSD para diferença estatística entre grupos ($P \leq 0,05$).

5.1.4 Resultado macroscópico dos fígados

O tratamento do grupo controle (T1) apresentou uma superfície hepática com coloração, tamanho e consistência normal (Figura 2). As aves que receberam apenas a vacina 9R (T3), apresentaram um leve aumento no tamanho do fígado, consistência firme e lobos arredondados com presença de alguns pontos avermelhados (Figura 3).

As aves somente intoxicadas (T5) e aves intoxicadas e vacinadas (T4 e T7) apresentaram um fígado friável com coloração amarelada e presença de pontos avermelhados múltiplos, ocupando quase toda a superfície dos lobos, de aproximadamente 0,1-0,2 cm. Bile com coloração verde clara (Figura 4). As aves que receberam adsorvente na dieta (T2, T6 e T8) apresentaram fígado com coloração normal, pequenas áreas mais congestionadas, tamanho e consistências normais (Figura 5).



Figura 2 – Fígado do tratamento controle (T1).



Figura 3 – Fígado de aves que receberam apenas a vacina 9R (T3).

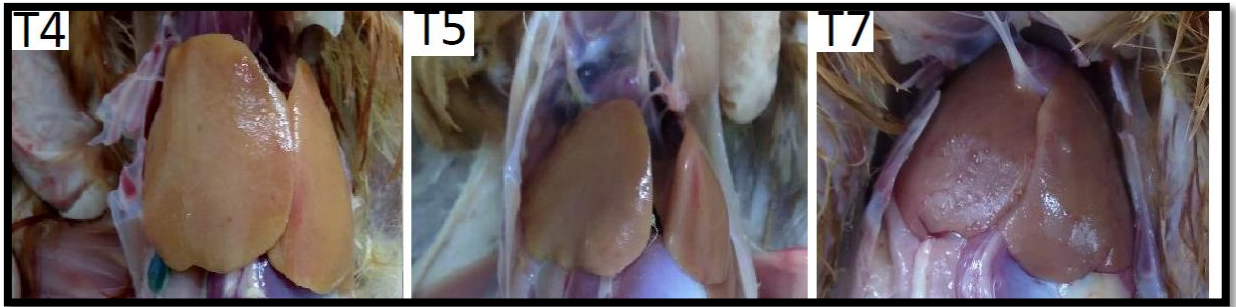


Figura 4 – Fígados de aves intoxicadas sem adsorvente na dieta.

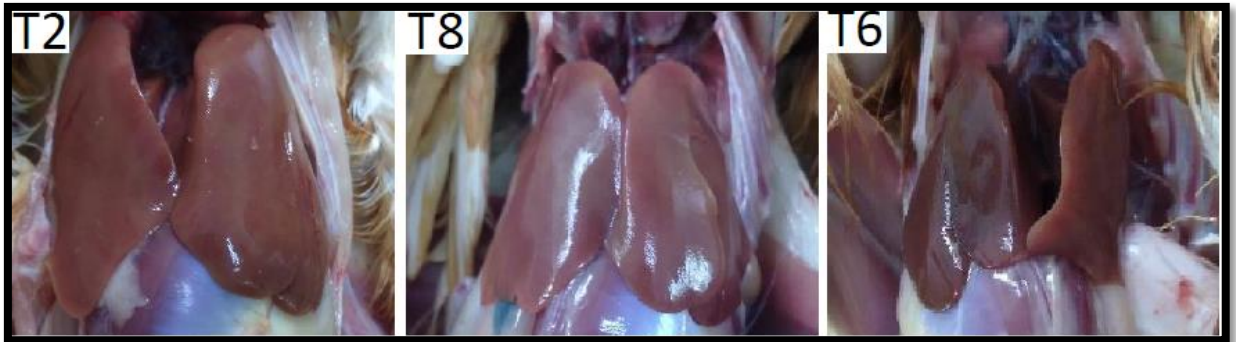


Figura 5 – Fígados de aves intoxicadas com adsorvente na dieta.

5.1.5 Resultados histopatológicos de fígados de aves intoxicadas

Os resultados histopatológicos dos fígados do tratamento 5, aves somente intoxicadas com 2,5 ppm de AFLA, apresentaram vacúolos de lipídeos (Figura 6) e células inflamatórias entre os hepatócitos e extensas áreas de necrose (Figura 7).

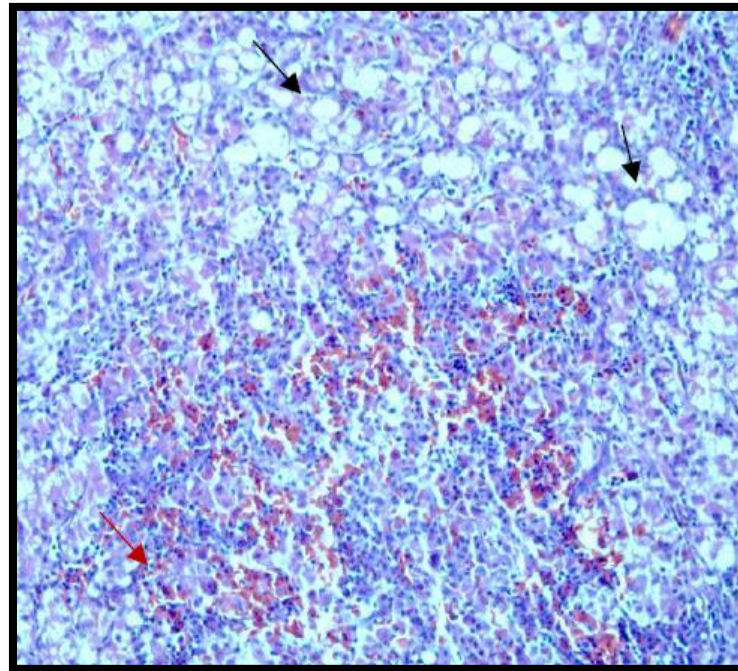


Figura 6 - Fragmento de fígado de ave do grupo T5.

Notar os vacúolos de lipídeo formados nos hepatócitos (setas); áreas de necrose; e infiltrados de hemácias e células inflamatórias dispersas (setas vermelhas).

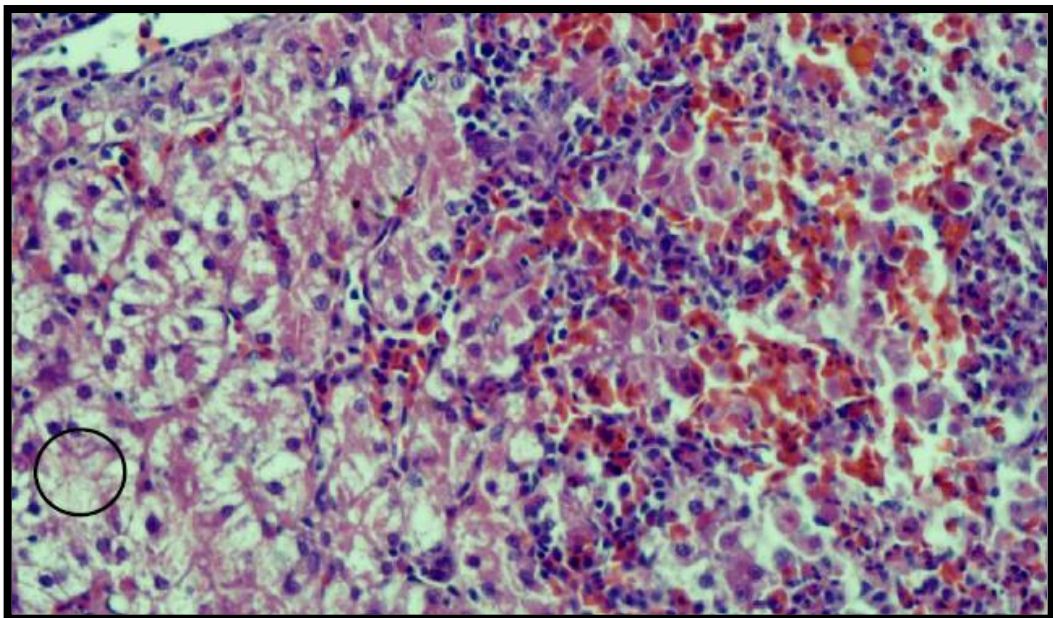


Figura 7 - Fragmento de ave do grupo T5.

Notar a população de células inflamatórias dispersos entre os hepatócitos, sendo a maioria linfócitos e heterófilos, associados a hemácias; e áreas de necrose (círculos).

5.2 Células do sistema imune

5.2.1 Linfócitos B

5.2.1.1. Efeitos somente da vacina 9R

Embora sem diferença significativa ($p < 0,05$), a porcentagem de linfócitos B no sangue das aves aumentou na coleta dos 31 dias de idade (3 dias depois da vacina). Esse aumento pode ser observado quando comparamos o controle (T1) com aves que receberam apenas a vacina 9R (T3). Porém, nas coletas 41 e 49 dias não se observou aumento na concentração de linfócitos B em relação ao grupo vacinado (T3), ao contrário, reduziu a concentração de linfócitos B, principalmente aos 42 dias de idade (Tabela 6).

5.2.1.2 Efeitos das aflatoxinas

Quando comparado a influência das aflatoxinas, ou seja, tratamento controle (T1) com aves apenas intoxicadas sem o estímulo da vacina (T5) não se observou diferença significativa nos diferentes dias de coletas (Tabela 5). Porém, a influência das aflatoxinas com estímulo da vacina (T4), aumentou a concentração de linfócitos B nas coletas (42 e 49 dias) das aves intoxicadas comparadas com aves somente vacinadas (T3), embora sem respaldo estatístico.

5.2.1.3 Efeitos do adsorvente

A inclusão de 1 kg p/ tonelada de adsorvente na dieta aumentou ($p < 0,05$) a concentração de linfócitos B na coleta dos 31 dias. Esse aumento pode ser observado quando comparamos aves vacinadas e intoxicadas sem a inclusão do adsorvente (T7) com aves vacinadas e intoxicadas com a inclusão do adsorvente (T8). Porém, aos 49 dias nessa mesma comparação, ocorre uma redução significativa ($p < 0,05$) na concentração de linfócitos B.

Ao avaliarmos a inclusão de 2,5 kg de adsorvente na dieta em aves vacinadas e intoxicadas, observamos uma redução de linfócitos B em todas as coletas. Essa redução pode ser observada na Tabela 6, quando comparamos aves intoxicadas e vacinadas (T4) com aves intoxicadas e vacinadas com a inclusão de adsorvente (T2).

Tabela 6 - Percentagem de Linfócitos B em relação ao total de células imunes no sangue.

% de Linfócitos Bu – 1a ⁺						
Tratamentos				Coletas		
Nº	Vacina	AFLA	AAM	31 dias	42 dias	49 dias
T1	-	-	-	7,87 ± 7,95 ^b	0,33 ± 0,55 ^a	6,12 ± 2,78 ^a
T2	SG9R	2,5 PPM	2,5 Kg	4,24 ± 2,69 ^b	0,14 ± 0,11 ^a	2,86 ± 1,82 ^b
T3	SG9R	-	-	13,25 ± 15,93 ^b	0,10 ± 0,05 ^a	3,63 ± 2,14 ^a
T4	SG9R	2,5 PPM	-	8,92 ± 7,28 ^b	2,78 ± 0,50 ^a	6,77 ± 5,75 ^a
T5	-	2,5 PPM	-	9,89 ± 5,61 ^b	0,14 ± 0,15 ^a	10,02 ± 2,62 ^a
T6	-	2,5 PPM	2,5 Kg	7,90 ± 4,77 ^b	0,20 ± 0,34 ^a	7,37 ± 1,85 ^a
T7	SG9R	1 PPM	1 Kg	4,08 ± 4,83 ^b	1,06 ± 2,72 ^a	7,34 ± 2,36 ^a
T8	SG9R	1 PPM	1 kg	29,25 ± 28,26 ^a	0,04 ± 0,02 ^a	2,24 ± 3,24 ^b

A estatística foi realizada separada em cada coleta, comparando as médias de todos os grupos entre si. As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de teste de Fisher PLSD para diferença estatística entre grupos ($P \leq 0,05$). Média ± Desvio Padrão.

5.2.2 Linfócitos T Auxiliares Periféricos (CD4⁺TCRVβ1⁻)

5.2.2.1 Efeitos Somente da Vacina 9R

Não foi observado diferença estatística de aves controle para aves vacinadas nas concentrações de linfócitos T auxiliares periféricos. No entanto, a vacina 9R reduziu a concentração de linfócitos T auxiliares periféricos em todas as coletas. Conforme a Tabela 7, embora sem respaldo estatístico, a redução é observada quando comparamos o tratamento controle (T1) com o tratamento envolvendo apenas aves vacinadas (T3).

5.2.2.2 Efeitos das Aflatoxinas

Não foi observado diferença significativa ($p < 0,05$) quando avaliamos somente a comparação do tratamento controle (T1) com aves apenas intoxicadas (T5). No entanto, quando aplicada a vacina em aves intoxicadas, a concentração de linfócitos T auxiliares periféricos reduziu drasticamente. Essa redução pode ser observada quando comparamos aves somente vacinadas (T3) com aves vacinadas e intoxicadas (T4), apresentando diferença significativa nas coletas de 31 e 42 dias (Tabela 7).

5.2.2.3 Efeitos do Adsorvente

O efeito do adsorvente sem o estímulo da vacina, ou seja, comparando apenas aves intoxicadas (T5) com aves intoxicadas e com adsorvente na dieta (T6) não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos em todas as coletas, conforme a Tabela 7.

Porém, ao avaliarmos o efeito do adsorvente em aves intoxicadas e estimuladas pela vacina observamos que houve um aumento de linfócitos T auxiliares periféricos com diferença significativa ($p < 0,05$) na coleta dos 42 dias. O aumento dessa concentração pode ser observado quando comparamos animais vacinados e intoxicados (T4) com animais vacinados, intoxicados e com a inclusão de adsorvente na dieta (T2). No entanto, dentro dessa mesma analogia, ao compararmos aves vacinadas que tiveram uma intoxicação menor de AFLA (T7) comparadas com aves de mesma intoxicação e também com inclusão menor de adsorvente (T8) não observamos alteração significativa nas concentrações (Tabela 7).

Tabela 7 - Percentagem de Linfócitos T auxiliares periféricos em relação ao total de células imune

% Linfócitos T Auxiliares Periféricos (CD4 ⁺ TCRVβ1 ⁻)						
Tratamentos				Coletas		
Nº	Vacina	AFLA	AAM	31 dias	42 dias	49 dias
T1	-	-	-	11,36 ± 8,99 ^a	7,38 ± 4,11 ^a	2,00 ± 1,17 ^a
T2	SG9R	2,5 PPM	2,5 Kg	1,45 ± 1,17 ^b	5,96 ± 1,72 ^a	1,64 ± 0,47 ^a
T3	SG9R	-	-	3,11 ± 0,98 ^a	4,99 ± 1,41 ^a	2,00 ± 0,83 ^a
T4	SG9R	2,5 PPM	-	2,78 ± 2,23 ^b	3,11 ± 0,45 ^b	1,71 ± 0,50 ^a
T5	-	2,5 PPM	-	11,91 ± 7,82 ^a	4,40 ± 1,34 ^a	1,37 ± 0,40 ^a
T6	-	2,5 PPM	2,5 Kg	5,44 ± 5,76 ^a	5,47 ± 2,07 ^a	1,22 ± 0,37 ^a
T7	SG9R	1 PPM	1 Kg	3,10 ± 2,15 ^a	5,16 ± 2,84 ^a	1,26 ± 0,30 ^a
T8	SG9R	1 PPM	1 kg	2,80 ± 1,89 ^a	4,33 ± 1,27 ^a	1,30 ± 0,51 ^a

A estatística foi realizada separada em cada coleta, comparando as médias de todos os grupos entre si. As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de teste de Fisher PLSD para diferença estatística entre grupos ($P \leq 0,05$). Média ± Desvio Padrão.

5.2.3 Linfócitos T auxiliares de mucosas

5.2.3.1 Efeitos somente da vacina 9R

Conforme a Tabela 8, a vacina 9R apresentou uma redução em todas as coletas na concentração de linfócitos T auxiliares de mucosas, quando comparado aves do tratamento controle (T1) com aves vacinadas somente (T3). No entanto, não foi observado diferença

estatística entre esses tratamentos.

5.2.3.2 Efeitos das aflatoxinas

A influência das aflatoxinas em tratamentos sem a utilização da vacina também reduziu a concentração de linfócitos T auxiliares de mucosas em todas as coletas. Essa redução podemos observar na comparação do tratamento controle (T1) com aves apenas intoxicadas (T5), apresentando diferença estatística significativa ($p < 0,05$) na coleta dos 31 dias (Tabela 8). A redução na concentração também é observada em tratamentos com aves intoxicadas com a utilização da vacina. Conforme a Tabela 8 essa redução ($p < 0,05$) pode ser observada quando comparamos aves somente vacinadas (T3) com aves vacinadas e intoxicadas (T4) nas coletas de 31 e 42 dias.

5.2.3.3 Efeitos do Adsorvente

O efeito adsorvente sem a presença da vacina não apresentou diferença significativa em todas as coletas. Conforme a Tabela 8, essa avaliação pode ser observada na comparação do tratamento envolvendo apenas aves intoxicadas (T5) com aves intoxicadas com adsorvente na dieta (T6).

No entanto, o efeito do uso do adsorvente na dieta de aves vacinadas e intoxicadas aumentou a concentração de linfócito T auxiliares de mucosas nas coletas dos 31 e 42 dias. Ou seja, comparando aves vacinadas e intoxicadas (T4) com aves vacinadas, intoxicadas com adsorvente (T2), existe diferença estatística significativa ($p < 0,05$) nas coletas dos 31 e 42 dias. Esse aumento foi observado somente no tratamento onde a inclusão do adsorvente foi de 2,5 kg por tonelada.

Tabela 8 - Percentagem de Linfócitos T auxiliares de mucosas em relação ao total de células imunes no sangue.

% Linfócitos T Auxiliares de Mucosas (CD4 ⁺ TCRVβ1 ⁺)						
Tratamentos				Coletas		
Nº	Vacina	AFLA	AAM	31 dias	42 dias	49 dias
T1	-	-	-	12,77 ± 5,86 ^a	0,92 ± 0,32 ^a	5,17 ± 3,20 ^a
T2	SG9R	2,5 PPM	2,5 Kg	7,69 ± 5,58 ^a	0,77 ± 0,32 ^a	3,46 ± 0,81 ^a
T3	SG9R	-	-	9,74 ± 6,34 ^a	0,66 ± 0,34 ^a	4,46 ± 2,22 ^a
T4	SG9R	2,5 PPM	-	3,35 ± 0,91 ^b	0,46 ± 0,15 ^b	3,90 ± 1,21 ^a
T5	-	2,5 PPM	-	4,22 ± 2,71 ^b	0,74 ± 0,28 ^a	4,85 ± 1,56 ^a
T6	-	2,5 PPM	2,5 Kg	3,87 ± 3,15 ^b	1,02 ± 0,42 ^a	3,81 ± 1,05 ^a
T7	SG9R	1 PPM	1 Kg	4,59 ± 4,08 ^b	0,87 ± 0,55 ^a	3,86 ± 0,88 ^a
T8	SG9R	1 PPM	1 kg	3,64 ± 3,26 ^b	0,75 ± 0,19 ^a	3,81 ± 1,46 ^a

A estatística foi realizada separada em cada coleta, comparando as médias de todos os grupos entre si. As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de teste de Fisher PLSD para diferença estatística entre grupos ($P \leq 0,05$). Média ± Desvio Padrão.

5.2.4 Linfócitos Citotóxico de Mucosas (CD4⁻TCRVβ1⁺)

5.2.4.1 Efeitos somente da vacina 9R

Conforme a Tabela 9, não foi observado diferença significativa na concentração de linfócitos citotóxico de mucosas na comparação do tratamento controle (T1) junto ao tratamento apenas de aves vacinadas (T3) em todas as coletas.

5.2.4.2 Efeitos das aflatoxinas

Ao avaliarmos a concentração de linfócitos citotóxico de mucosas de aves do tratamento controle (T1) e compararmos com aves intoxicadas apenas (T5), observamos uma redução da concentração em todas as coletas. Porém, sem diferença estatística (Tabela 9). As aflatoxinas também reduziram a concentração de linfócitos citotóxico de mucosas de aves vacinadas intoxicadas nas coletas de 42 e 49 dias. Essa redução pode ser observada quando comparamos aves apenas vacinadas (T3) com aves vacinadas e intoxicadas (T4), apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) na coleta aos 42 dias (Tabela 9).

5.2.4.3 Efeitos do adsorvente

Em tratamentos onde não foi realizado a vacina, não observamos diferença significativas de aves somente intoxicadas (T5) de aves intoxicadas com adsorvente na dieta

(T6). No entanto, quando comparamos aves vacinadas e intoxicadas (T4; T7) com aves vacinadas e intoxicadas com adsorvente na dieta (T2 e T8) temos um aumento na concentração de linfócitos citotóxico de mucosas nos tratamentos que receberam o adsorvente a partir dos 42 dias. Esse aumento pode ser observado com diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparamos os tratamentos T2 com T4 aos 42 dias e quando comparamos o T7 com o T8 aos 49 dias.

Tabela 9 - Percentagem de linfócitos T citotóxico de mucosas em relação ao total de células imunes no sangue.

% Linfócitos T Citotóxico de Mucosas (CD4 ⁺ TCRVβ1 ⁺)						
Tratamentos				Coletas		
Nº	Vacina	AFLA	AAM	31 dias	42 dias	49 dias
T1	-	-	-	2,61 ± 2,13 ^a	1,62 ± 0,58 ^a	3,11 ± 1,96 ^a
T2	SG9R	2,5 PPM	2,5 Kg	0,83 ± 0,61 ^a	1,23 ± 0,71 ^a	1,85 ± 0,56 ^a
T3	SG9R	-	-	2,15 ± 1,81 ^a	1,33 ± 0,62 ^a	2,33 ± 1,22 ^a
T4	SG9R	2,5 PPM	-	2,38 ± 1,99 ^a	0,64 ± 0,17 ^b	1,71 ± 0,76 ^a
T5	-	2,5 PPM	-	1,43 ± 0,99 ^a	1,25 ± 0,47 ^a	2,00 ± 0,69 ^a
T6	-	2,5 PPM	2,5 Kg	1,73 ± 1,03 ^a	1,15 ± 0,27 ^a	1,60 ± 0,76 ^a
T7	SG9R	1 PPM	1 Kg	2,09 ± 1,52 ^a	1,28 ± 0,68 ^a	1,51 ± 0,26 ^b
T8	SG9R	1 PPM	1 kg	1,71 ± 1,61 ^a	1,32 ± 0,42 ^a	2,48 ± 1,12 ^a

A estatística foi realizada separada em cada coleta, comparando as médias de todos os grupos entre si. As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de teste de Fisher PLSD para diferença estatística entre grupos ($P \leq 0,05$). Média ± Desvio Padrão.

5.2.5 Linfócitos T citotóxico ativados (CD8⁺CD28⁻)

5.2.5.1 Efeitos Somente da Vacina 9R

A concentração de linfócitos T citotóxico ativados de aves vacinadas diminui em comparação ao controle na maioria das coletas. Essa redução pode ser observada quando comparamos aves do tratamento controle (T1) com aves somente vacinadas (T3), apresentando diferença estatística ($p < 0,05$) nos dias 31 e 49 (Tabela 10).

5.2.5.2 Efeitos das aflatoxinas

Conforme a Tabela 10, não foi observado diferença significativa quando avaliamos aves apenas intoxicadas (T5) com aves do tratamento controle (T1). No entanto, quando comparamos aves vacinadas e intoxicadas (T4) com aves somente vacinadas (T3), as aflatoxinas reduziram a concentração de linfócitos T citotóxico ativados nas coletas dos 31 e 42 dias, aumentando essa concentração na coleta dos 49 dias com diferença estatística ($p < 0,05$).

5.2.5.3 Efeitos do adsorvente

As concentrações de linfócitos T citotóxico ativados nas aves intoxicadas que receberam o adsorvente (T6) na dieta apresentaram redução em relação ao tratamento de aves apenas intoxicadas (T5) em todas as coletas e com diferença significativa ($p < 0,05$) na coleta do dia 31 (Tabela 10).

Conforme Tabela 10, o efeito do adsorvente junto as aves vacinadas e intoxicadas não apresentou diferença significativa em todas as coletas. Essa constatação pode ser melhor observada quando comparamos aves vacinadas e intoxicadas (T4 e T7) com aves vacinadas e intoxicadas com adsorvente na dieta (T2 e T8).

Tabela 10 - Percentagem de linfócitos T citotóxico ativados em relação ao total de células imunes no sangue.

% de Linfócitos T Citotóxico Ativados (CD8 ⁺ CD28 ⁻)						
Tratamentos				Coletas		
Nº	Vacina	AFLA	AAM	31 dias	42 dias	49 dias
T1	-	-	-	9,53 ± 7,38 ^a	1,26 ± 0,97 ^a	2,53 ± 1,27 ^a
T2	SG9R	2,5 PPM	2,5 Kg	0,78 ± 0,68 ^b	1,11 ± 0,49 ^a	0,87 ± 0,27 ^b
T3	SG9R	-	-	2,24 ± 0,90 ^b	1,36 ± 0,97 ^a	1,00 ± 0,46 ^b
T4	SG9R	2,5 PPM	-	1,51 ± 1,13 ^b	0,59 ± 0,15 ^b	1,38 ± 0,63 ^a
T5	-	2,5 PPM	-	9,86 ± 5,80 ^a	2,00 ± 1,17 ^a	2,78 ± 1,21 ^a
T6	-	2,5 PPM	2,5 Kg	1,58 ± 1,72 ^b	1,14 ± 0,43 ^a	1,92 ± 0,62 ^a
T7	SG9R	1 PPM	1 Kg	1,50 ± 1,52 ^b	1,31 ± 1,04 ^a	1,74 ± 0,56 ^a
T8	SG9R	1 PPM	1 kg	1,08 ± 0,99 ^b	1,29 ± 0,49 ^a	1,86 ± 0,57 ^a

A estatística foi realizada separada em cada coleta, comparando as médias de todos os grupos entre si. As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de teste de Fisher PLSD para diferença estatística entre grupos ($P \leq 0,05$). Média ± Desvio Padrão.

5.2.6 Monócitos

5.2.6.1 Efeitos somente da vacina 9R

Quando comparamos o tratamento controle (T1) com aves apenas vacinadas (T3), observamos uma concentração menor de monócitos na coleta dos 31 dias. Porém, nas coletas subsequentes a concentração de monócitos de aves vacinadas apresentou-se sempre maior comparadas as aves controle sem vacina, até mesmo, apresentando diferença estatística ($p < 0,05$) na coleta dos 42 e 49 dias (Tabela 11).

5.2.6.2 Efeitos das aflatoxinas

O efeito do tratamento apenas com aves intoxicadas (T5) diminuiu a concentração de monócitos na coleta dos 31 dias comparadas com aves controle (T1). Porém, aumentou nas coletas de 42 e 49 dias. As coletas apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) na concentração de monócitos de aves apenas intoxicadas (T5) comparadas com o controle (T1) nos 31 e 49 dias (Tabela 11).

Ao avaliarmos a influência das aflatoxinas na presença da vacina, a concentração de monócitos apresenta uma característica semelhante à comparação sem a vacina, ou seja, na coleta dos 31 dias apresenta uma concentração menor, aumentando nas coletas dos 42 e 49 dias. Essa constatação pode ser observada, conforme a Tabela 11, quando comparamos aves somente vacinadas (T3) com aves vacinadas e intoxicadas (T4).

5.2.6.3 Efeito do adsorvente

Conforme Tabela 11, não ocorreu diferença estatística na concentração de monócitos sem a presença da vacina quando comparamos aves intoxicadas (T5) com aves intoxicadas com adsorvente na dieta (T6) nas coletas dos 31 e 42 dias. Porém, na coleta dos 49 dias a concentração de monócitos de aves que receberam o adsorvente (T6) é significativamente ($p < 0,05$) menor que aves apenas intoxicadas (T5).

Na comparação de aves vacinadas e intoxicadas (T4 e T7) com aves vacinadas e intoxicadas com adsorvente na dieta (T2 e T8), também não foi observado diferença estatística na concentração de monócitos. Embora, as aves do T8 comparadas as aves do T7 apresente uma concentração bastante grande de monócitos na coleta dos 49 dias (Tabela 11).

Tabela 11 - Percentagem de Monócitos em relação ao total de células imunes no sangue.

% de Monócitos (Kul ⁺ MHCII ⁺)						
Tratamentos				Coletas		
Nº	Vacina	AFLA	AAM	31 dias	42 dias	49 dias
T1	-	-	-	8,28 ± 4,27 ^a	2,09 ± 1,38 ^b	18,51 ± 7,89 ^b
T2	SG9R	2,5 PPM	2,5 Kg	3,63 ± 2,86 ^a	11,14 ± 6,25 ^a	29,75 ± 5,35 ^a
T3	SG9R	-	-	6,49 ± 3,53 ^a	10,33 ± 4,43 ^a	22,63 ± 9,74 ^a
T4	SG9R	2,5 PPM	-	3,06 ± 0,89 ^a	19,26 ± 7,84 ^a	28,16 ± 9,28 ^a
T5	-	2,5 PPM	-	2,76 ± 2,06 ^b	2,61 ± 1,62 ^b	20,70 ± 8,27 ^a
T6	-	2,5 PPM	2,5 Kg	1,15 ± 0,88 ^b	4,91 ± 2,25 ^b	16,81 ± 5,30 ^b
T7	SG9R	1 PPM	1 Kg	3,91 ± 3,23 ^a	8,58 ± 4,84 ^a	23,86 ± 4,51 ^a
T8	SG9R	1 PPM	1 kg	4,15 ± 3,27 ^a	7,36 ± 3,05 ^a	31,73 ± 9,56 ^a

A estatística foi realizada separada em cada coleta, comparando as médias de todos os grupos entre si. As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de teste de Fisher PLSD para diferença estatística entre grupos ($P \leq 0,05$). Média ± Desvio Padrão.

5.2.7 Heterófilos Fagocíticos

5.2.7.1 Efeitos Somente da Vacina 9R

Conforme a Tabela 12, a vacina 9R não apresentou diferença significativa quando comparamos o tratamento controle (T1) com o tratamento de aves apenas vacinadas (T3) em todas as coletas.

5.2.7.2 Efeitos das Aflatoxinas

As aflatoxinas aumentaram a concentração de heterofilos em todas as coletas, sendo estatisticamente significante ($p < 0,05$) a diferença na coleta dos 31 dias. Esse aumento na concentração pode ser observado quando comparamos aves controle (T1) com aves apenas intoxicadas (T5).

Conforme Tabela 12, as aves intoxicadas e vacinadas (T4) também apresentaram uma maior concentração de heterófilos fagocíticos comparadas com aves apenas vacinadas (T5). A concentração de 2,5 ppm de AFLA utilizada na intoxicação de aves vacinadas (T4) também apresentaram uma concentração maior de heterófilos quando comparado com aves vacinadas e intoxicadas com 1ppm de AFLA (T7). Ou seja, o aumento da concentração de aflatoxinas na intoxicação de aves vacinadas aumentou a concentração de heterófilos fagocíticos no sangue.

5.2.7.3 Efeito do Adsorvente

Pelo fato das aflatoxinas aumentarem a concentração dos heterófilos no sangue, os tratamentos envolvendo o uso adsorvente na dieta de aves diminuíram a concentração de heterófilos. Conforme a Tabela 12, essa diminuição pode ser observada quando comparamos as aves apenas intoxicadas (T5) com aves intoxicadas com adsorvente na dieta (T6), assim como aves vacinadas e intoxicadas (T4) com aves vacinadas e intoxicadas com adsorvente na dieta (T2).

Tabela 12 - Percentagem de Heterófilos Fagocíticos em relação ao total de células imunes no sangue.

				% de Heterófilos Fagocíticos		
Tratamentos				Coletas		
Nº	Vacina	AFLA	AAM	31 dias	42 dias	49 dias
T1	-	-	-	5,45 ± 7,27 ^b	1,23 ± 0,99 ^b	0,86 ± 0,94 ^a
T2	SG9R	2,5 PPM	2,5 Kg	0,79 ± 0,64 ^b	1,40 ± 0,92 ^b	0,63 ± 0,38 ^a
T3	SG9R	-	-	1,21 ± 0,69 ^b	1,47 ± 0,49 ^b	0,59 ± 0,38 ^a
T4	SG9R	2,5 PPM	-	3,04 ± 3,17 ^b	6,62 ± 5,64 ^a	0,78 ± 0,52 ^a
T5	-	2,5 PPM	-	13,29 ± 5,74 ^a	1,69 ± 1,50 ^b	1,14 ± 0,89 ^a
T6	-	2,5 PPM	2,5 Kg	2,30 ± 2,35 ^b	1,02 ± 0,43 ^b	1,42 ± 1,50 ^a
T7	SG9R	1 PPM	1 Kg	0,82 ± 0,63 ^b	1,67 ± 0,70 ^b	0,46 ± 0,28 ^a
T8	SG9R	1 PPM	1 kg	1,01 ± 0,76 ^b	3,06 ± 2,84 ^b	0,46 ± 0,36 ^a

A estatística foi realizada separada em cada coleta, comparando as médias de todos os grupos entre si. As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de teste de Fisher PLSD para diferença estatística entre grupos ($P \leq 0,05$). Média ± Desvio Padrão.

5.2.8 Monócitos Fagocíticos

5.2.8.1 Efeitos somente da vacina 9R

Conforme a Tabela 13, a utilização da vacina não apresentou nas aves diferença significativa na concentração de monócitos fagocíticos. Essa constatação pode ser observada quando comparamos aves controle (T1) com aves somente vacinadas (T3) em todas as coletas.

5.2.8.2 Efeitos das aflatoxinas

Conforme a Tabela 13, na comparação de aves controle (T1) com aves apenas intoxicadas (T5), não observamos diferença significativa de concentração de monócitos fagocíticos nas coletas. Porém, na coleta de 31 dias (3 dias depois da vacina), as aves

intoxicadas (T5) apresentam um aumento importante na concentração quando comparado ao controle (T1).

Quando envolve o estímulo da vacina, ou seja, aves vacinadas e intoxicadas (T4) comparados apenas com aves vacinadas (T3), a concentração de monócitos fagocíticos apresentou um aumento significativo na coleta dos 31 dias. No entanto, nas demais coletas as concentrações apresentaram semelhança.

A maior concentração de aflatoxinas na dieta de aves vacinadas não apresentou diferença na concentração de monócitos fagocíticos. Essa constatação é observada quando comparamos aves vacinadas e intoxicadas com 1 ppm de aflatoxinas (T7) com aves vacinadas e intoxicadas com 2,5 ppm de aflatoxinas (T4).

5.2.8.3 Efeito do Adsorvente

O efeito do adsorvente na concentração de monócitos fagocíticos foi possível se observar com diferença significativa ($p < 0,05$) somente na coleta de 31 dias, tanto em aves vacinadas como não vacinadas (Tabela 13).

A concentração de monócitos fagocíticos de aves não vacinadas e intoxicadas com adsorvente na dieta (T6) apresenta um aumento na concentração quando comparado com aves não vacinadas e intoxicadas (T5). Quando avaliamos a influência do adsorvente nos tratamentos vacinados, observamos uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na concentração dessas células. Essa diminuição pode ser observada quando comparamos aves vacinas e intoxicadas (T4 e T7), com aves vacinas e intoxicadas com adsorvente na dieta (T8 e T2). Destacando que o tratamento 8 a inclusão na dieta de adsorvente é de 1kg por tonelada e no tratamento 2 a inclusão é de 2,5 kg de adsorvente por tonelada (Tabela 13).

Tabela 13 - Percentagem de Monócitos Fagocíticos em relação ao total de células imunes no sangue.

% de Monócitos Fagocíticos						
Tratamentos				Coletas		
Nº	Vacina	AFLA	AAM	31 dias	42 dias	49 dias
T1	-	-	-	5,55 ± 5,54 ^b	27,95 ± 12,50 ^a	2,47 ± 2,09 ^a
T2	SG9R	2,5 PPM	2,5 Kg	7,85 ± 9,13 ^b	39,81 ± 14,96 ^a	3,19 ± 1,69 ^a
T3	SG9R	-	-	3,76 ± 1,50 ^b	34,93 ± 8,34 ^a	2,86 ± 2,13 ^a
T4	SG9R	2,5 PPM	-	13,96 ± 18,16 ^a	38,53 ± 13,83 ^a	1,76 ± 0,48 ^a
T5	-	2,5 PPM	-	6,02 ± 3,07 ^a	31,73 ± 13,24 ^a	2,14 ± 1,53 ^a
T6	-	2,5 PPM	2,5 Kg	18,27 ± 14,11 ^a	35,07 ± 19,87 ^a	1,70 ± 0,66 ^a
T7	SG9R	1 PPM	1 Kg	12,23 ± 12,72 ^a	40,85 ± 10,71 ^a	1,49 ± 0,26 ^a
T8	SG9R	1 PPM	1 kg	3,82 ± 3,85 ^b	39,46 ± 6,78 ^a	1,44 ± 0,57 ^a

A estatística foi realizada separada em cada coleta, comparando as médias de todos os grupos entre si. As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste de teste de Fisher PLSD para diferença estatística entre grupos ($P \leq 0,05$). Média ± Desvio Padrão

6 DISCUSSÕES

O presente trabalho buscou avaliar o comportamento de células do sistema imune junto a vacina SG9R, bem como o efeito dessa imunização em aves intoxicadas com aflatoxinas, correlacionando o efeito protetivo do uso ou não de adsorvente na dieta de poedeiras comerciais.

Conforme Batista (2017), um estudo “*in vivo*” da resposta imunológica desenvolvida contra *Salmonella Gallinarum* (SG) é difícil devido à alta mortalidade causada por esse microrganismo em aves suscetíveis. Em pesquisas realizadas por Wigley *et al.* (2005), é recomendado utilizar a vacina viva SG9R para promover estudos imunológicos mais prolongados, pois a mesma é capaz de induzir moderada sintomatologia do tifo aviário, sem provocar mortalidade nos animais. De acordo com essa pesquisa, a resposta imune humoral foi caracterizada pelo aumento de IgM com sete dias pós vacinação e alto nível de IgG entre as terceira e quarta semana pós vacinação. Após esse período, a quantidade de IgG decaiu até alcançar a homeostasia com seis semanas após vacinação.

O efeito da vacina SG9R, no presente estudo sobre a população de linfócitos B (Bu – 1a+), embora sem diferença estatística, também apresentou um aumento, 3 dias depois da vacina, na comparação de aves somente vacinadas (T3) comparadas aves não vacinadas (T1), decaindo sua concentração nas coletas subsequentes. Além disso, conforme Barrow (2007), esse tipo de vacina é mais eficiente na indução de estímulos junto à resposta imune celular.

Na maioria dos marcadores celulares utilizados, as concentrações de linfócitos T auxiliares (CD4+) e citotóxico (CD8+) avaliados no presente trabalho não apresentou diferença significativa entre aves controle não vacinadas (T1) e aves somente vacinadas (T3). A exceção são os linfócitos T citotóxico ativados (CD8+CD28-), no qual apresentaram uma redução significativa ($P < 0,05$) na sua concentração em aves vacinadas (3 e 21 dias após a vacinação).

Os resultados acima citados, são divergentes de muitos estudos já publicados. Pois, em sua grande maioria, é relatado o aumento na concentração de linfócitos auxiliares e citotóxicos após a vacinação ou inoculação experimental com SG (Wigley *et al.* 2005, Kamble *et al.* 2017, DIAZ, 2014). No entanto, em estudos recentes, Adam *et al.* (2017) encontraram intensa redução na concentração total de linfócitos e heterófilos em poedeiras de linhagem Isa Brown® a partir de 7 após inoculação com 0.5 ml de 9×10^8 UFC de SG.

O efeito da vacina SG9R, não alterou a atividade fagocítica dos monócitos e heterófilos quando comparamos o tratamento controle (T1) com aves apenas vacinadas (T3). No entanto, ao avaliarmos a concentração de monócitos (Kul+MHCII+), as aves vacinadas apresentaram sempre maior concentração quando comparadas com as aves controle sem vacina, até mesmo,

apresentando diferença estatística ($P < 0,05$) na coleta dos 42 e 49 dias. De acordo, Berchieri Júnior (2009), o aumento na concentração de leucócitos, é atribuído à multiplicação rápida de *Salmonella Gallinarum* dentro dos fagócitos, com posterior lise celular e liberação da bactéria no compartimento extracelular, provocando forte resposta imune.

Em relação à intoxicação das aves com aflatoxinas, o desafio foi bem-sucedido. O primeiro parâmetro que consegue validar essa informação foram os pesos das aves intoxicadas. Todos os tratamentos que receberam aflatoxinas sem a utilização do adsorvente na dieta, apresentaram uma redução significativa de peso em comparação com aves não intoxicadas. Essa redução no peso corporal das aves também foi observada por Oliveira *et al.* (2001), quando a intoxicação a partir de 1 mg/kg de AFB1, alterou o desempenho de poedeiras jovens. Em estudos analíticos de desempenho, comprovou-se que diferentes níveis de aflatoxinas influenciam significativamente ($p < 0,05$) no peso médio e no ganho de peso de poedeiras (SILOTO *et al.* 2013, GUL *et al.* 2017, OLIVEIRA *et al.* 2017).

Outra característica que contribui bastante na comprovação de que a intoxicação experimental foi eficiente, são os resultados macroscópicos e microscópicos dos fígados. Os fígados das aves somente intoxicadas (T5) apresentaram severo dano hepático (necrose), com degeneração gordurosa e alterações de tamanho. Essas características de lesões hepáticas foram também evidenciadas por Kumar e Balachandran (2009), junto a intoxicação com 1 ppm de aflatoxinas em frangos de corte. Conforme, Abdul-Aziz (2016), os fígados das aves alimentadas com aflatoxinas revelam principalmente degeneração gordurosa, necrose focal de hepatócitos, hiperplasia biliar e infiltração de linfócitos.

Os efeitos secundários no fígado e a natureza imunossupressora são áreas mais documentadas em relação à citotoxicidade das aflatoxinas. Existem muitos estudos contraditórios disponíveis, no entanto, os efeitos negativos das aflatoxinas sobre a imunidade mediada por células e humoral, parecem ser melhor evidenciados em doses respectivamente de 0,4 e 1 ppm (YUNUS *et al.*, 2011).

No presente trabalho, embora sem diferença significativa ($p < 0,05$), a influência das aflatoxinas aumentou a concentração de linfócitos B nas coletas (31 e 49 dias) das aves intoxicadas e vacinadas, comparadas com aves somente vacinadas (T3). Resultado contrário a muitas pesquisas publicadas, principalmente utilizando vacinas virais vivas, onde as concentrações de anticorpos são menores em aves intoxicadas com aflatoxinas (TESSARI, 2014). A esse respeito, Yunus *et al.* (2011), relata que muitos experimentos indicam que a resposta imune humoral em aves pode aumentar ou diminuir. Ou seja, depende da concentração de AFLA, tempo de exposição, tempo entre a aplicação da vacina/coleta de sangue e a linhagem

que se destina as aves. Uma explicação, proposta por Azzam e Gabal (1997), trata do efeito da toxina sobre o epitélio associado ao folículo (FAE) na bolsa de Fabricius, levando a um aumento de anticorpos séricos e, conseqüentemente, à redução da semivida do anticorpo.

Segundo Mallmann *et al.* (2016), apesar de existir consenso sobre a imunotoxicidade, seu mecanismo de ação ainda não está bem elucidado. Assim sendo, a imunidade mais afetada é a celular e a aflatoxina B1 afeta principalmente os linfócitos T, incluindo tanto as células celulares T auxiliares quanto as T citotóxicas.

O experimento realizado demonstrou uma redução importante nas concentrações de linfócitos T auxiliares e citotóxicos de aves intoxicadas com aflatoxinas. Nas populações com função de imunidade em mucosas (TCRV β 1+), a redução se observou em ambas doses de intoxicação (1 e 2,5 ppm), até mesmo sem a presença do estímulo da vacina. Embora, a diferença significativa ($p < 0,05$) nas concentrações dessas células entre aves intoxicadas e não intoxicadas ocorreu somente na presença do estímulo vacina. Nas populações de linfócitos auxiliares periféricos (CD4+TCRV β 1-) a influência das aflatoxinas também reduziu as concentrações dessas células, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) nas coletas de 31 e 42 dias de aves vacinadas (T3) e vacinadas e intoxicadas (T4). Porém, a intoxicação com 1ppm não foi suficiente para reduzir a concentração de linfócitos T auxiliares periféricos de forma significativa.

Conforme pesquisas desenvolvidas por Miglino (2012), a inclusão de milho, naturalmente contaminado com 2905 ppb de aflatoxinas e 125 ppb de fumonisinas, diminuiu significativamente linfócitos T CD4+ e CD8+ na mucosa intestinal das aves comparado com aves que receberam milho de boa qualidade. Em estudo conduzido por Jiang *et al.* (2015), as porcentagens de linfócitos T em células intra-epiteliais (IELs), linfócitos da lâmina própria (LPLs) e expressão de mRNA de citocinas de duodeno, jejuno e íleo tiveram tendências decrescentes em frangos intoxicados com 0,6 ppm de aflatoxina B1. Em poedeiras comerciais alimentadas com milho e trigo naturalmente contaminados com *Fusarium* toxinas, Chowdhury *et al.*, (2005), constataram redução na contagem de células brancas, linfócitos B, linfócitos T CD4+ e CD8+ no sangue. Em estudo de Girgis *et al.* (2010), frangos corte desafiados com *Eimeria maxima* e alimentadas com grãos naturalmente contaminados por *Fusarium* toxinas, também apresentaram drástica redução nas populações de linfócitos T CD4+ e CD8+ na mucosa do jejuno.

Apesar de existirem muitas pesquisas nos últimos anos, os mecanismos exatos da imunossupressão das aflatoxinas em células T não está claramente compreendido. A este respeito, Surai e Dvorska (2005) analisaram alguns aspectos da imunotoxicidade induzida por

AFB1. Trata-se de uma observação geral, onde o tamanho dos órgãos linfoides não é normal em aves expostas à AFB1. Nessas pesquisas, a depleção de células linfoides no timo, baço e Bursa de Fabricius foi descrita. Durante estudos anteriores sobre os efeitos de AFB1, Tung *et al.* (1970) descreveram o aumento induzido pela toxina na atividade enzimática lisossômica nos músculos hepático e esquelético da galinha. Esses autores postularam que esse aumento na atividade lisossômica, além de outros fatores, poderia afetar negativamente a integridade do tecido durante a aflatoxicose. A esse respeito, a dieta AFB1 foi encontrada por Çelik *et al.* (2000) para resultar em degeneração do epitélio associado ao cortex no timo de frangos de corte. Além dos efeitos sobre os tecidos linfoides, os efeitos não específicos da toxina na síntese de proteínas através da inibição da RNA polimerase, peroxidação lipídica e lesão hepática também são considerados como resultado de uma produção reduzida de células T (YUNUS *et al.*, 2011).

O presente trabalho também encontrou uma redução ($p < 0,05$) na concentração de monócitos (Kul^+MHCII^+) nas coletas de aves intoxicadas com 2,5 ppm de aflatoxinas (T5) comparadas aves controle (T1) aos 31 dias de idade. Porém, nas demais coletas não se observou diferença na concentração dessas células. Em estudos realizados por Neeff (2016), os monócitos também apresentaram redução significativa em frangos de corte que receberam 0,5 ppm de AFB1 na coleta de 21 dias. No entanto, o mesmo estudo relata que não houve diferença aos 42 dias de idade em relação a aves intoxicadas e não intoxicadas. Como em ambos os experimentos as aves intoxicadas perderam peso, é muito provável que para compensar o déficit de síntese proteica ocasionado pela intoxicação das aflatoxinas, o metabolismo das aves tenha utilizado reservas de proteínas destinadas ao crescimento para suprir suas necessidades imunológicas.

Em relação a atividade fagocítica, a concentração de heterófilos e monócitos fagocíticos apresentaram aumento de concentração nas coletas de 31 e 42 dias. As aves intoxicadas e vacinadas (T4) também apresentaram uma maior concentração de heterofilos fagocíticos comparadas com aves apenas vacinadas (T5). Aos 42 dias a concentração de 2,5 ppm de AFLA utilizada na intoxicação de aves vacinadas (T4) apresentaram uma concentração maior de heterofilos quando comparado com aves vacinadas e intoxicadas com 1ppm de AFLA (T7). Ou seja, aumentando a concentração de aflatoxinas na intoxicação de aves vacinadas aumentou a concentração de heterofilos fagocíticos no sangue. O efeito da aflatoxina sobre a capacidade fagocítica de células mononucleares de aves está relatado na literatura primordialmente através de estudos “*in vitro*”, com resultados alternados. Contudo, o conjunto de trabalhos publicados (TESSARI *et al.*, 2006; CHANG *et al.*, 1979; TESSARI, 2004; NEEFF, 2016) indica efeito supressor também sobre a capacidade fagocítica das células mononucleares, ao contrário do que foi encontrado no presente estudo. No entanto, é importante ressaltar que os trabalhos

comparados não são com poedeiras comerciais, mas sim de experimentos com frangos de corte.

Os efeitos da aflatoxicose relatados anteriormente foram majoritariamente revertidos pela adição do adsorvente na dieta. Tanto a lesão hepática, quanto o peso das aves foram limitados e praticamente neutralizados pela inclusão do aditivo antimicotoxinas. Em relação as células do sistema imune, o efeito benéfico do produto sobre os linfócitos se deu principalmente nos tratamentos em que as aves eram vacinadas. Ou seja, na comparação de aves vacinadas intoxicadas com adsorvente na dieta (T2) com aves intoxicadas e vacinadas (T4).

As concentrações de linfócitos T auxiliares de mucosas ($CD4+TCRV\beta1+$) e citotóxicos de mucosas ($CD4-TCRV\beta1+$), aumentaram na presença do adsorvente com inclusão de 2,5 kg por tonelada, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) sobre tudo nas coletas dos 31 dias. As concentrações de linfócitos auxiliares periféricos ($CD4+TCRV\beta1^-$) também apresentaram uma maior concentração na inclusão de 2,5 kg, com diferença significativa ($p < 0,05$) aos 42 dias.

A menor concentração do aditivo (1kg) que foi usada nos animais desafiados com 1 ppm de AFLA (T8), não foi suficiente para reverter os efeitos da micotoxina sobre os linfócitos T. Embora o tratamento tenha prevenido as lesões hepáticas mesmo em concentração mais baixa, a presença desse efeito imune indica que pode ser necessário manter a concentração mais alta do aditivo mesmo quando o desafio da toxina é reduzida.

Em relação aos tipos celulares que a influência das aflatoxinas aumentaram sua concentração no sangue (linfócitos B, monócitos e heterófilos fagocíticos) a inclusão de 2,5 kg do adsorvente teve um efeito antagonico, diminuindo as concentrações. Porém, sem diferença estatística em sua maioria.

Conforme Gimeno e Martins (2011), os adsorventes possuem a habilidade de se aderir à micotoxina e impedir sua absorção no trato digestório, tornando-a inerte e diminuindo sua toxicidade para as aves. Dentre as argilas e seus derivados as mais usadas são a sepiolita, aluminossilicato de sódio e cálcio (ASSCA), bentonitas e a diatomitas. Adsorventes a base de aluminossilicato de sódio ou cálcio (ASSCA) são derivados das zeólitas, apresentando cargas negativas, já as aflatoxinas possuem forte carga positiva, podendo ser adsorvidas pelos ASSCA (BURAGAS, 2005).

Conforme Mallmann *et al.* (2015), a inclusão de 0,25% de um adsorvente a base de aluminossilicato na dieta de poedeiras comerciais, reduziu em 53 % a gravidade do dano hepático microscópico. Em avaliação similar, Calado (2016) encontrou desempenhos zootécnicos e quantidades de imunoglobulinas para Gumboro (IBVD) significativamente maiores em frangos de corte alimentados com 0,5 % de adsorvente a base de ASSCA e

desafiados naturalmente com 0,2 ppm de aflatoxinas. No entanto, Sobrane Filho (2014) relata que a inclusão de adsorvente 0,2 e 0,3% na dieta de aves intoxicadas com 2 ppm de aflatoxinas não conseguiu reverter totalmente os danos ocasionados em parâmetros hematológicos, embora a adição do ASSCA tenha reduzido perdas zootécnicas. De acordo com Gimeno e Martins (2011), nem toda a micotoxina é 100% sequestrada pelos adsorventes, ocorrendo assim absorção de uma fração reduzida, conseqüentemente, afetando o metabolismo do animal.

7 CONCLUSÃO

A vacina SG9R promoveu uma redução significativa na concentração de linfócitos T citotóxicos ativados (CD8+CD28-). Tornando esse marcador, um bom parâmetro para ser analisado antes e depois da imunização com *Salmonella Gallinarum* em poedeiras comerciais. Outra célula do sistema imune que foi estimulada pelo o efeito da vacina SG9R foram os monócitos (Kul+MHCII+), apresentando um aumento de concentração estatisticamente significativo a partir dos 14 dias após da vacina.

As aflatoxinas demonstraram efeito supressor nos linfócitos T auxiliares de mucosas (CD4+TCRV β 1+), linfócitos T auxiliares periféricos (CD4+TCRV β 1-) e linfócitos T citotóxico de mucosas (CD4-TCRV β 1+) em aves vacinadas. Apresentando diferença ($p < 0,05$) nas coletas com 3 e 14 dias após a vacinação. No entanto, as aflatoxinas aumentaram a concentração de monócitos e heterófilos fagocíticos.

A inclusão de 2,5 kg do adsorvente na dieta por tonelada de ração, neutralizou os efeitos das aflatoxicoses relatados acima, sobretudo nas concentrações de linfócitos T auxiliares de mucosas (CD4+TCRV β 1+), auxiliares periféricos (CD4+TCRV β 1-) e citotóxicos de mucosas (CD4-TCRV β 1+). Aumentando a concentração dessas células na com diferença ($p < 0,05$) 21 dias após a vacinação.

8 REFÊRENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular**, v. 5 Rio de Janeiro, v. 5, p. 17-43, 2005.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**, 8ª Ed. Philadelphia, p.05-46, 2015.

ABDUL-AZIZ, A. T.; FLETCHER, O.; BARNES, H. J. **Avian Histopathology**, 4ª Ed, p.412, 2016.

ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2017**. Disponível em: < http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf > Acesso em dez. 2017.

ADAM, C. M.; SANI, A.; JOHN, G. J.; NELSON, E. K. A.; HASSAN, A.; ABDULAZEEZ, S.N.; LUKA, J.; MUHAMMAD, Y. Haematological Changes in Layers Experimentally Infected with Salmonella Gallinarum. **African Journal of Cellular Pathology**, 2017.

ANDRADE, C. Y. T.; YAMANAKA, I.; SCHLICHTA, L.; SILVA, S. K.; PICHETH, G. F.; CARON, L. F.; FREITAS, R. A.; MOURA, J.; ALVARENGA, L.M. Physicochemical and immunological characterization of chitosan-coated bacteriophage nanoparticles for in vivo mycotoxin modeling. **Elsevier Carbohydrate Polymers**, nº 185, p.63–72, 2018.

APINCO, Produção de Pintos de Corte, **Estatísticas e Preços**. 2017. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br/index.php?page=estatisticaseprecos&acao=producaopintos> >, Acesso em Jan. 2018.

ARAUJO, G.; MORAES, H. L. S.; SALLE, C.T.P. A. Avaliação da suscetibilidade de quatro linhagens de frangos de corte à aflatoxina B1. **Ciências Agrárias**. nº 171. 2004. Disponível em: < <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/54162/000440846.pdf?sequence=1> > acesso em jan. 2018.

ASHEG, A. A.; LEVKUT, M.; REVAJOVÁ, V.; ·EVÁÍKOVÁ, Z.; KOLODZIEYSKI, L.; PISTL, J. Dynamics of lymphocyte subpopulations in immune organs of chickens infected with Salmonella enteritidis. **Acta Veterinaria Brunensis**, v.72, p.359-364, 2003.

AZZAM, A. H.; GABAL, M. A. Interaction of aflatoxin in the feed and immunization against selected infectiuos disease. I. **Infectious bursal disease**. **Avian Pathology**, v.26, p.317-325, 1997.

BALESTIERI, F.M.P. Células do Sistema Imune. **Imunologia Avançada**. São Paulo, p. 230-240, 2005.

BARROW, P. A. Salmonella infections: immune and non-immune protection with vaccines. **Avian Pathology, Abingdon**, v. 36, n. 1, p. 1-13, 2007.

BARROW, P. A.; FREITAS NETO, O. C. Pullorum disease and fowl typhoid – new thoughts on old disease: a review. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 40, n. 1, p. 1-13, 2011.

BARROW, P. A.; WALLIS, T. S. Vaccination against Salmonella infections in food animals: rationale, theoretical basis and practical application. In: Wray, C. (Ed.) **Salmonella in domestic animals**. CAB International, Oxford, England, p.323339, 2000.

BARUA, A.; YOSHIMURA, Y. Ovarian cell-mediated immune response to Salmonella enteritidis infection in laying hens (*Gallus domesticus*). **Poultry Science**, v.83, n.6, p.997-1002, 2004.

BASTOS, A. P.; CARON, L.; Vacinação e fatores que influenciam a eficácia da vacinação em aves. **Revista Avicultura Industrial**, v.1247, p.17-20, 2016.

BATISTA, D. F. A. **Avaliação da patogenicidade de estirpes mutantes de Salmonella Gallinarum biovar Gallinarum para genes relacionados ao metabolismo naturalmente defectivos em S. Gallinarum biovar Pullorum**. 2011, 111f Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2017.

BEIRÃO, B.C.B. **Avaliação do perfil imune de aves empregando citometria de fluxo**. 2011. 131 f. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

BERCHIERI JUNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. 2. ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p. 435-454. 2009.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; MURPHY, C. K.; MARSTON, K.; BARROW, P. A. Observations on the persistence and vertical transmission of Salmonella enterica serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. **Avian Pathology: journal of the W.V.P.A**, London, v. 30, n.1, p. 229239, 2001.

BERNDT, A.; PIEPER, J.; METHNER, U. Circulating gamma delta T cells in response to Salmonella enterica serovar enteritidis exposure in chickens. **Infection and Immunity**, v.74, n.7, p.3967-3978, 2006.

BIEHL, M. L. & BUCK, W. B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **Journal of Food Protection**, v.50, p.1058-1073, 1987.

BLALOCK, J.E. The Immune System as a Sensory Organ. 1984. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/citation/132/3/1067>. Acessado em 6 de Agosto de 2016.

BRADEN, C. *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis en eggs: A national epidemic in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v.43, p. 515-517, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 7. **Diário oficial da União**, República Federativa do Brasil, Brasília – DF, 22 fev, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria MA/ SNAD/ SFA nº 07. **Diário Oficial da União**, Brasília, 9 nov. Seção 1, p.21968, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Sanidade Avícola. Instrução Normativa 78. **Diário oficial da União**, República Federativa do Brasil, Brasília – DF, nov, Seção 1, p.3, 2003.

BRIDLE, B. W.; JULIAN, R.; SHEWEN, P. E.; VAILLANCOURT, J. P.; KAUSHIK, A. K. T lymphocyte subpopulations diverge in commercially raised chickens. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.70, n.3, p.183-190, 2006.

BROWNLIE, R.; ALLAN, B. Avian toll-like receptors review. **Cell tissue research**, Berlin, v.343, n.7, p.121-130, 2011.

BURAGAS, A. **Comportamento alimentar de codornas poedeiras (*Coturnix Japonica*) recebendo rações com diferentes micotoxinas**. 2005. 64 f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CALADO, V.H.V. **Efeitos do uso de adsorventes em frangos de corte alimentados com dietas naturalmente contaminadas com aflatoxina e fumonisina**. 2016, 48f. Dissertação de Mestrado. Faculdade em Ciência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2016.

CALICH, V.; VAZ C. Sistema Imune. **Imunologia Aplicada**. São Paulo, v.1, p. 105-109, 2001.

CAMPBELL, T.W. **Hematology of birds**. In: THRALL, M.A. Veterinary hematology and clinical chemistry. Philadelphia. Cap. 17, p. 225-257, 2004.

CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C. Estudo dos Parâmetros Hematológicos em Frangos de Corte. **Arq. Instituto Biológico**, São Paulo, v.70, p.419-424, 2003.

CARDOSO, B.; ROCHA, L. C. **Controle de salmonelas em avicultura através do uso de vacina**. V Simpósio de Sanidade Avícola da UFSM, Santa Maria, 10 e 11 Ago, 2006.

CARON, L.F. O Sistema Imune das Aves. **Relatório 15º curso de sanidade avícola Fortdodge**, Jaguariúna, p.7-11, 2008.

CORRIER, D.E. Mycotoxins: Mechanism of immunosuppression. **Vet. Immunol**, v.30, p.73–87, 1991.

COLVERO, I. P. Micotoxicose em aves. **Revisão de literatura. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**, Campo Grande, p.34, 2008.

CHANG, C.F.; HAMILTON, PATB. Impairment of Phagocytosis in Chicken Monocytes during Aflatoxicosis. **Poult Sci**. v.58, p.562–6, 1978.

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

CHUAMMITRI, P.; OSTOJIC, J.; ANDREASEN, C. B.; REDMOND, S. B.; LAMONT S. J.; PALIC, D. Chicken heterophil extracellular traps (HETs): novel defense mechanism of chicken heterophils. **Vet. Immunol. Immunopathol**. v.129, p.126–131, 2009.

CIHAK, J.; HOFFMANN-FEZER, G.; ZIEGLER, H.W.; STEIN, H.; KASPER B.; CHEN, C.H. T cells expressing the V beta 1 T-cell receptor are required for IgA production in the chicken. **Proceedings of the National Academy of Sciences Magazine**. n° 88, p. 10951-10955, 1991. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC53050/>> Acesso em Jan. 2018.

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

COULOMBE, R. A. Aflatoxins. In: SHARMA, R. P.; SALUNKHE, D. K. (Eds.). **Mycotoxins and Phytoalexins**. London, p. 103-144, 1991.

ÇELIK, I.; OGUZ, H.; DEMENT, Ö.; DÖNMEZ, H.H.; BOYDAK, M.; SUR, E. Efficacy of polyvinylpolypyrrolidone in reducing the immunotoxicity of aflatoxin in growing broilers. **Br. Poult. Sci**, n° 41, p.430–439, 2000.

DÍAZ, S.J.A.; **Imunidade de Aves (Gallus gallus) para Salmonella entérica Subesp. Entérica Sorovar Gallinarum biovar Gallinarum**. 2014. 93 f. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

DIETERT, R. R.; LAMONT, S. J. Current Advances in Avian Immunology. **Poultry Science**, v. 73, p. 975-978, 1994.

DILKIN, P.; MALLMANN, C.A.; SANTURIO, J.; HICKMANN, J. **Produção de Micotoxinas**. Revista Ciência Rural, Santa Maria, p.133, 1998.

ERF, G. F. **Cell-mediated immunity in poultry**. Poultry Science, v. 83, n. 4, p. 580-590, 2008. FACTA – Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas. **Frango Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br/index.php?page=estatisticaseprecos&acao=carnefrango>> Acesso em dez. 2017.

ESTUPINAN, A.L.P.C. **Ressurgência do tifo aviário na avicultura industrial brasileira: novos estudos epidemiológicos de uma enfermidade antiga**. 2016. 82 f. Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2016.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Food Outlook**. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i7343e.pdf>> Acesso em dez. 2017.

FAIR, J.M.; TAYLOR, K.J.; SHOU, Y.; MARRONE B.L. Immunophenotyping of chicken peripheral blood lymphocyte subpopulations: individual variability and repeatability. **Vet. Immunol. Immunopathol**. v. 125, p.268-273, 2008.

FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; SCHALM, O. W. **Schalm`s veterinary hematology**. Iowa:Wiley-Blackwell, 2006.

FELLAH, J.S.; JAFREDO, T.; DUNON, D. **Development of avian immune system**. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SACHAT, K.A. Avian Immunology, Cap. 4, p. 5-67.2008.

FERNANDES, D.C.; ETO, S.F.; CLAUDIANO, G.S.; MARCUSSO, P.F.; LOUREIRO, B.A. Biologia do sistema imune das aves – Revisão. **Revista Anhanguera Educacional Ltda.** v. 17, nº 3, p.131-140, 2014.

FREITAS NETO, O. C.; SETTA, A.; IMRE, A.; BUKOVINSKI, A.; Altaeb ELAZOMI, A.; Pete KAISER, A.; BERCHIERI JUNIOR, A.; BARROW, P.; Michael JONES, M. A flagellated motile Salmonella Gallinarum mutant (SG Fla+) elicits a pro-inflammatory response from avian epithelial cells and macrophages and is less virulent to chickens. **Veterinary Microbiology, Amsterdam**, v. 165, n. 3-4, p. 425-433, Aug., 2013.

GHOSH, R. C. Immunosuppression in broiler under experimental aflatoxicosis. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 146, p. 457-462, 1990.

GIACOMINI, L.; FICK, F. A.; DILKIN, P.; MALLMANN, C. A.; RAUBER, R.H.; ALMEIDA, C. Desempenho e plumagem de frangos de corte intoxicados por aflatoxinas. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 234-239, 2006.

GIMENO, A.; MARTINS, M. L. Mycotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos. 3. ed. Miame. **Rev. Special Nutrients**, 2011.

GIRGIS, G. N.; BARTA, J. R.; GIRISH, C. K.; KARROW, N. A.; BOERMANS, H. J.; SMITH, T. K. Effects of feed-borne Fusarium mycotoxins and na organic mycotoxin adsorbent on immune cell dynamics in the jejunum of chickens infected with Eimeira maxima. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 138, p. 218-223,2010.

GOMPERTZ, O. F., GAMBALE, W., PAULA, C. R., CORRÊA, B. Fungos Tóxicos. IN: TRABULSI, L. R., ALTERTHUM, **Fundamentos da Microbiologia**. São Paulo, p.505-506, 2005.

GUIMARÃES, L. D.; MORAES, A. N. D. Anestesia em aves: agentes anestésicos. **Ciência Rural**, v.30, p.1073-1081, 2000.

GUL H.; KHAN, S.; SHAH, Z.; AHMAD, S.; ISRAR, M.; HUSSAIN, M. Effects of local sodium bentonite as aflatoxin binder and its effects on production performance of laying hens. **Kafkas Univ Vet Fak Derg**, v.23, p.31-37, 2017.

GRECCHI, R.; SALIBA, A.M.; MARIANO, M. Morphological changes, surface receptors and phagocytic potential of fowl mononuclear phagocytes and thrombocytes in vivo and in vitro. **Journal of Pathology**., v.130, p.23-31, 1980.

HOLT, P.S.; VAUGHN, L.E.; GAST, R.K. Flow cytometric characterization of Peyer's patch and cecal tonsil T lymphocytes in laying hens following challenge with Salmonella enterica serovar Enteritidis. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 133, p. 276-281, 2010.

IARC – International Agency for Research on Cancer. Some mycotoxins – Aflatoxins, p. 171-301. In: **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Traditional Herbal Medicines**, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene, v. 82, 2002.

ISA Instituto de Seleção Animal. Guia de Manejo de Nutrição de Poedeiras Comercias. **ISA Founders**. nº 10, p.4-9, 2009.

ISA Instituto de Seleção Animal. Sistema Alternativos de Criação. **ISA Founders**. v. 14.8, p.40-54, 2014.

JIANG, M.; PENG, X.; FANG, J.; CUI, H.; YU, Z.; CHEN, Z. Effects of Aflatoxin B1 on T-Cell Subsets and mRNA Expression of Cytokines in the Intestine of Broilers. **International Journal of Molecular Sciences**. p.6445, 2015.

JONES, M. A.; WIGLEY, P.; PAGE, K. L.; HULME, S. D.; BARROW, P. A. *Salmonella enterica* serovar Gallinarum requires the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system but not the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system for virulence in chickens. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 9, p. 5471-5476, 2001.

KAISER, P. Advances in avian immunology-prospects for disease control: a review, **Avian Pathology**, volumen 39, p.309-324, 2010.

KAISER, P.; ROTHWELL, L.; GALYOV, E. E.; BARROW, P. A.; BURNSIDE, J.; WIGLEY, P. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* and *Salmonella gallinarum*. **Microbiology Reading**, v. 146, pt. 12, p. 3217-3226, 2000.

KAMBLE, N. M.; HYOUNG, K. J.; LEE, J.H. Intracellular delivery of HA1 subunit antigen through attenuated *Salmonella Gallinarum* act as a bivalent vaccine against fowl typhoid and low pathogenic H5N3 virus. **Vet Res**, v.48, p.40, 2017.

KLASING, K.C. Avian macrophages: regulators of local and systemic immune responses. **Poultry Science**, n° 77, p.983- 989, 1998.

KOGUT, M.H., IQBAL, M., HE, H., PHILBIN, V., KAISER, P. & SMITH, A. Expression and function of Toll-like receptors in chicken heterophils. **Developmental and Comparative Immunology**, n° 29, p.791-807. 2005

KUMAR, R.; BALACHANDRAN, C. Histopathological changes in broiler chickens fed aflatoxin and cyclopiazonic acid. **Veterinarski Arhiv**, v.79, p.31-40, 2009.

LAHTI, J. M.; CHEN, C. L.; TJOELKER, L. W.; PICKEL, J. M.; SCHAT, K. A.; CALNEK, B. W.; THOMPSON, C. B.; COOPER, M. D. Two distinct alpha beta T-cell lineages can be distinguished by the differential usage of T-cell receptor V beta gene segments. **Proceedings of the National Acadademy of Sciences of the USA**, v.88, n.23, p.10956-10960, 1991.

LAZZÁRI, F. A. **Umidade, Fungos e Micotoxinas na Qualidade de Sementes, Grãos e Rações**. Curitiba, p. 73-123, 1997.

LEESON, S.; DIAZ, G. J.; SUMMERS, J. D. **Poultry metabolic disorders and mycotoxins**. Guelph: University Books, 1995.

LEFFER, E. V. B. Considerações sobre o controle da doença de Gumboro. **Animal World. Revista Aveword**, São Paulo. P.45-48, 2004.

LILLEHOJ, H. S. Analysis of Eimeria acervulina-induced changes in the intestinal T lymphocyte subpopulations in two chicken strains showing different levels of susceptibility to coccidiosis. **Res. Vet. Science.** n° 56, p.1-7, 1994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7908452>> Acesso Jan. 2018.

LINSLEY, P. S.; LEDBETTER, J. A. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. **Annual Review of Immunology**, v.11, p.191-212, 1993.

LYNN, D.J., HIGGS, R., LLOY, A.T., O'FARRELLY, C., HERVE, V., NYS, Y. Avian beta-defensin nomenclature: a community proposed update. **Immunology Letters**, v.110, p.86-89. 2007.

MACEY, M. **Flow cytometry principles and applications**. Totowa:Humana press, 2007. In: BEIRÃO, B.C.B. Avaliação do perfil imune de aves empregando citometria de fluxo. Dissertação de Mestrado Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p.18-20, 2011.

MALLMANN, C. A; DILKIN, P. Aflatoxinas. **Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos**. Santa Maria, 2007. 238 p.

MALLMANN, C.A.; DILKIN, P; MALLMANN, A.O. Micotoxicoses e Imunossupressão na Avicultura Brasileira. **Revista Avisite**, v.101, n.5, p.22-23. 2016.

MALLMANN, C.A.; DILKIN, P; MALLMANN, A.O. **Panorama das Micotoxinas**. VI Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal, v.2, p.17-21, 2014.

MALLAMANN, C. A.; STURZA, D.; GIACOMINI, L.; CONTRERAS, M.; ZAVIEZO, D. Effect of aflatoxin and a comercial anti-mycotoxin additive on performance egg quality, and liver integrity of Brown layers. **PSA Annual Meeting**. Kentucky, 2015.

MAST, J.; GODDEERIS, B. M. Development of immunocompetence of broiler chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.70, n.3-4, p.245-256, 1999.

MCCORKLE, F.M. Nonlymphoid cells and a their factors in immune response. **Poultry Science**, p. 963-967, 1998.

MENDONÇA, J.F.P.; MARTINS N.R.S.; CARVALHO L.B.; SÁ M.E.P; Melo C.B. Bronquite infecciosa das galinhas: conhecimentos atuais, cepas e vacinas no Brasil. **Revista Rural Sci.** v.39, p. 2559-2566, 2009.

MIGLINO, L.B. **Efeito de Milho Naturalmente Contaminado com Micotoxinas sobre a Imunidade e Desempenho em Frangos de Corte**. 2012. 63 f. Dissertação de Mestrado – Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.2012.

MERKLEY, J. W.; MAXWELL, R. J.; PHILLIPS, J. G.; HUFF, W. E. Hepatic fatty acid profiles in aflatoxin-exposed broiler chickens. **Poultry Science**, v. 66, p. 59-64, 1987.

MONTASSIER, H.J. Importância da imunidade em pintos na primeira semana de vida. In: **Conferência Apinco de ciência e tecnologia avícolas**, Campinas, p. 99-120, 1998.

MORGULIS, M. S. *Imunologia aplicada*. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: v. 1, p. 231-245, 2002.

NABESHIMA, S.; MURAT, M.; KIKUCHI, K.; IKEMATSU, H.; KASHIWAGI, S.; HAYASHI, J. A reduction in the number of peripheral CD28+CD8+T cells in the acute phase of influenza. **Clin. Exp. Immunol.** n° 128, p.339-46, 2002. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11985525> Acesso em Jan. 2018.

NAGARAJAN, M. M.; KIBENGE, F. S. Infectious bursal disease virus: a review of molecular basis for variations in antigenicity and virulence. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.61, n.2, p.81-88, 1997.

NEEFF, D. V. **Efeitos da Administração da Aflatoxina, Fumonisina e Curcumina, Isoladas ou Associadas, sobre a Resposta Imunológica Humoral e Determinação de Produtos de Biotransformação em Frangos de Corte**. 2016. 133 f. Tese de Doutorado – Faculdade de Zootécnica e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2016.

NORIEGA, M.L.V.C. Apuntes de hematología aviar. **Revisión por la Universidad Nacional Autónoma de México**, Ciudad de Mexico, p. 76-79, 2000.

OIE, **Listed diseases, infections and infestations in force in 2018**. Disponível em: <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2018>, acesso em Fev. 2018.

OLÁH, I.; VERVELDE, L. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K. A. **Avian Immunology**. Academic Press, 2008.

OLIVEIRA, C. A. F.; ALBUQUERQUE, R.; CORREA, B.; KOBASHIGAWA, E.; REIS, T. A.; FAGUNDES, A. C. A.; Lima, F. R. Produção e qualidade dos ovos de poedeiras submetidas à intoxicação prolongada com aflatoxina B1. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.68, p.1-4, 2001.

OLIVEIRA, G. H.; FERNANDES, A. C.; BERCHIERI JÚNIOR A. Experimental infection of laying hen with Salmonella Gallinarum. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 36, n.1, p. 51-56, Jan.- Mar. 2005.

OLIVEIRA, C. A. F.; NEEFF, D. V.; CARÃO, A. C. P.; CORASSIN, C. H. Mycotoxin Impact on Egg Production. In: HESTER, P. Y. **Egg Innovations and Strategies for Improvements**. 1.ed. Elsevier, p.581-596, 2017.

OSWEILER, G. D. Mycotoxins and livestock: What role do fungal toxins play in illness and production losses? **Veterinary Medicine**, v.85, p.1009-1016, 1990.

PAWELEC, G.; AKBAR, A.; CARUSO C.; EFFROS, R.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B.; WIKBY, A. Is immunosenescence infectious. **Trends Immunol.** n° 25, p.406-410, 2004. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15275638> Acesso em Jan. 2018.

PIER, A. C. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3964-3967, 1992.

POMEROY, B. S.; NAGARAJA, K. V. Fowl typhoid. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; REID, W. M.; YODER, W. H. Ed. In: **Diseases of Poultry**. 9th ed. Ames: Iowa State University Press, p. 87-99, 1991,

QURESHI, M. A. et al. Understanding Immunology in Disease Development and Control, **Poultry Science**, n° 77, p. 1126–1129, 1998.

RAMOS, A. J. & HERNANDEZ, E. In situ absorption of aflatoxins in rat small intestine. **Mycopathologia**, v.134, p.27-30, 1996.

SALLE, C.T.P.; MORAIS, H.L.S. Prevenção de doenças/manejo profilático/Monitoria. In: BERCHIERI Jr, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. FACTA, Campinas. V.1, p.3-12, 2000.

SALLE, C.T.P.; RODRIGUES, O.; BAVARESCO, A.; LORENZINI, G.; MORAES, H. L. S.; SILVA, A. B.; SALLE, F.O.; NASCIMENTO, V. P.; FALLAVENA, L. C. B. Detecção de aflatoxina B1, no organismo de frangos de corte através do emprego de ensaio imunoenzimático utilizando anticorpos monoclonais (ELISA). **Acta scientiae veterinariae**. v. 30 , n. 1, p. 27-30. 2002.

SANTIN, E. Micotoxicoses. In: BERCHIERI JÚNIOR, A., MACARI, M, (Ed.). **Doença das aves**. Campinas: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, p. 379-388, 2000.

SANTURIO, J. M. O uso correto de adsorventes para micotoxinas. In: **III Encontro técnico sobre avicultura de corte da região de Descalvado**. p.28-45, 1999.

SETTA, A. M.; BARROW, P. A.; KAISER, P.; JONES, M. A. Early immune dynamics following infection with *Salmonella* enterica serovars enteritidis, infantis, pullorum and gallinarum: cytokine and chemokine gene expression profile and cellular changes of chicken cecal tonsils. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Oxford, v. 35, n. 5, p. 397- 410, 2012.

SHARMA, J. **Avian Cellular Immunology**. 1. CRC Press, 1990.

SHIVAPRASAD, H. L. Fowl Typhoid and Pullorum Disease. **Revue Scientifique et Technique - Office International des Epizooties**, Paris, v. 19, n. 2, p. 405-424, 2000.

SHIVAPRASAD, H. L.; BARROW, P. A. Pullorum disease and fowl typhoid. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. **Diseases of poultry**.12. ed. Ames: Iowa State Press, p. 620-636, 2008.

SILOTO, E. V.; OLIVEIRA, E. F. A.; SARTORI, J. R.; FASCINA, V. B.; MARTINS, B. A. B.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. E.; SARTORI, D. R. Lipid metabolism of commercial layers fed diets containing aflatoxin, fumonisin, and a binder. **Poultry Science**. v.92, p.2077-2083, 2013.

SMITH, J. E.; ROSS, I. C. The toxigenic Aspergilli. In: SMITH, J. E.; HENDERSON, R. S. (ED.). 2001, London. **Mycotoxins and animal foods**. London: CRC Press, 1991. p.31-61.

SURAI, P.F.; DVORSKA, J.E. Effects of mycotoxins on antioxidant status and immunity. In: DIAZ, D.E. **The Mycotoxin Blue Book**. UK, p. 93–137, 2005.

TALEBI, A.; ASRI-REZAEI, S.; ROZEH-CHAI, R.; SAHRAEI, R. Comparative Studies on Haematological Values of Broiler Strains (Ross, Cobb, Arbor-acres and Arian). **International Journal of Poultry Science**, v.4, n.8, p.573-579, 2005.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. S. P. Aflatoxinas em frangos de corte. **Centro avançado de ensino e pesquisa do agronegócio avícola**. n. 78 São Paulo, 2008.

TESSARI, E. N. C. Efeitos da administração de aflatoxina B1 e fumonisina B1 sobre frangos de corte. Dissertação de Mestrado em Zootecnia Universidade de São Paulo, p. 130, 2004.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A.L. S.P. Efeitos da Aflatoxinas Sobre as Aves. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.18, 2012.

TESSARI, E. N. C.; OLIVEIRA, C. A. F.; CARDOSO, A. S. P.; LEDOUX, D. R. ROTTINGHAUS, G. Parâmetros hematológicos de frangos de corte alimentados com ração contendo aflatoxina B1 e fumonisina B1. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.3, p.924-929, 2006.

TIZARD, I. A. Os órgãos do sistema imune. In: TIZARD, I A. **Imunologia Veterinária**. São Paulo, p. 79-97. 1998.

TREGASKES, C.; KONG, F.; PARAMITHIOTIS, E.; CHEN, C.; RATCLIFFE, M.; DAVISON, T.; YOUNG, J. Identification and analysis of the expression of CD8 alpha beta and CD8 alpha isoforms in chickens reveals a major TCR-gamma delta CD8 alpha beta subset of intestinal intraepithelial lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v.154, n.9, p.4485-4494, 1995.

TREVISOL, I.M. Sistema Imune das Aves. 2006, Disponível em <http://www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=artigos&codartigo=3152006>, acessado em 18 de junho de 2016.

TUNG, H.T.; DONALDSON, W.E.; HAMILTON, P.B. Effects of aflatoxin on some marker enzymes of lysosomes. **Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj**, nº 222, p.665–667. 1970.

SOBRANE FILHO, S.T. **Adsorvente de micotoxinas em dietas de frangos de corte contendo aflatoxina e fumonisina**. 2014, 58f. Dissertação de mestrado. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Universidade Estadual Paulista, 2014.

UMAR, S.; MUNIR, M.T.; AHSAN, U.; RAZA, I.; CHOWDHURY, M.R.; Z. AHMED, Z.; SHAH, M.A.A. Immunosuppressive interactions of viral diseases in poultry. **World's Poultry Science Journal**, vol. 73, p.131-132, 2017.

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

VIERTLBOECK, B.; GÖBEL, T.W.F. Avian T cells: Antigen recognition and lineages. **Avian Immunology**. v. 1, p.91-96, 2008.

WIGLEY, P.; HULME, S.; POWERS, C.; BEAL, R.; SMITH, A.; BARROW, P. Oral infection with the Salmonella enterica serovar Gallinarum 9R attenuated live vaccine as a model to characterise immunity to fowl typhoid in the chicken. **BMC Veterinary Research**, Londres, v. 1, n. 2, p. 1-6, 2005.

WYANT, T. L.; TANNER, M. K.; STEIN, M. B. Salmonella typhi flagella are potent inducers of proinflammatory cytokine secretion by human monocytes. *Infection and Immunity*, Washington, DC, v. 67, n. 7, p. 3619-3624, Jul.,1999.

WYATT, R. D. Poultry. In: SMITH J. E. & HENDERSON, R. S. (Ed). *Mycotoxins and animal foods*. Athens **CRC Press**, 1991. cap. 24, p. 553-605, 1991.

ZANCAN, F.T. **Eficácia de programas vacinais contra o tifo aviário em poedeiras comerciais (Gallus) utilizando a estirpe atenuada Salmonella Gallinarum cobS-cbiA**. 2013. f. 58. Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, p.7-8, 2013.

ZEKARIAS, B.; HUURNE, A. A. H. M. T.; LANDMAN, W. J. M.; REBEL, J. M. J.; POL, J. M. A.; GRUYS, E. Immunological basis of differences in disease resistance in the chicken. **Veterinary Research**, v.33, n.2, p.109-125, 2002.

ANEXO 1. Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias – UFPR.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 031/2017, referente ao projeto “AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR JUNTO A VACINA DE Salmonella GALLINARUM EM AVES IMUNOSSUPRIMIDAS COM AFLATOXINAS”, sob a responsabilidade de Luiz Felipe Caron – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 2 de invasividade, em reunião de 05/05/2017.

Vigência do projeto	Junho/2017 até Agosto/2017
Espécie/Linhagem	<i>Gallus gallus domesticus</i> (ave) / HyLine
Número de animais	144
Peso/Idade	50 g / 1 dia
Sexo	Fêmea
Origem	Avipec em Curitiba, Paraná

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 031/2017, regarding the project “Evaluation of the cellular immune responses of aflatoxin-immunosuppressed birds against Salmonella Gallinarum” under Luiz Felipe Caron supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree 2 of invasiveness, in session of 05/05/2017.

Duration of the project	June/2017 until August/2017
Specie/Line	<i>Gallus gallus domesticus</i> (bird) / HyLine
Number of animals	144
Wheight/Age	50 g / 1 day
Sex	Female
Origin	Avipec in Curitiba, Paraná

Curitiba, 5 de maio de 2017.

Chayane da Rocha

Chayane da Rocha

Coordenadora CEUA-SCA

ANEXO 2. Tabela de Conforto Térmico e de Umidade Relativa para ISA-BROWN®.

Age(Days)	Brooding temperature At the edge of the brooders	Brooding temperature At 2/3m from the brooders	Room temperature	Relative humidity optimal & maxi- mal in %
0 – 3	35°C	29 - 28°C	33 - 31°C	55 – 60
4 – 7	34°C	27°C	32 - 31°C	55 – 60
8 – 14	32°C	26°C	30 - 28°C	55 – 60
15 – 21	29°C	26 - 25°C	28 - 26°C	55 – 60
22 – 24		25 - 23°C	25 - 23°C	55 – 65
25 – 28		23 - 21°C	23 - 21°C	55 – 65
29 – 35		21 - 19°C	21 - 19°C	60 – 70
After 35		19 - 17°C	19 - 17°C	60 - 70

