

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**“ENCEFALOMALÁCIA NUTRICIONAL
EM *Gallus gallus domesticus*. ESTUDO SOBRE A
PATOGENIA E A PARTICIPAÇÃO DE ASTRÓCITOS”.**

Guilherme Sellera Godoy

Médico Veterinário

**JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
2006**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**“ENCEFALOMALÁCIA NUTRICIONAL EM
Gallus gallus domesticus. ESTUDO SOBRE A
PATOGENIA E A PARTICIPAÇÃO DE ASTRÓCITOS”.**

Guilherme Sellera Godoy

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Alessi

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - Universidade Estadual Paulista como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

**JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
2006**

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GUILHERME SELLERA GODOY - nascido no terceiro dia do mês de março, em mil novecentos e setenta e sete, na cidade de Santos-SP. É Médico Veterinário graduado no Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, localizada em Lages-SC, em janeiro de dois mil e um. Exerceu o cargo de Médico Veterinário Residente no Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, em Jaboticabal-SP no período entre fevereiro de dois mil e dois e janeiro de dois mil e quatro, sendo bolsista da FUNDAP. Leciona a disciplina Patologia Veterinária na Universidade de Franca desde setembro de dois mil e quatro e atua como Médico Veterinário, responsável pelo setor de Anatomia Patológica, no Hospital Veterinário da Universidade de Franca.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo Antonio Carlos Alessi, ou simplesmente, professor, que com seus conselhos, patológicos ou não, me fez acreditar que, nesses cinco anos de caminhada juntos, seria possível um dia eu me tornar um Médico Veterinário Patologista.

Aos meus professores de Patologia Veterinária, Célso Pilati, Renato de Silva e Sousa e Márcio Botelho de Castro, agradeço por terem e estarem direcionando meu caminho, mesmo que seja patológico..

Aos funcionários do Departamento de Patologia Veterinária, em especial ao Tel, Edgard e João, agradeço por sempre estarem dispostos a uma simples ajuda ou a uma longa conversa. Sem vocês este trabalho não seria possível.

Ao amigo Wanderson agradeço pela enorme ajuda dada em meu experimento. Sem você eu ainda estaria misturando o amido com o óleo.

Ao Rodrigo Bazoli (Stanley) e a empresa Guabi pela ajuda com as análises dos óleos.

Ao Marcelo Carneiro e a empresa Fri-Ribe pela elaboração dos suplementos vitamínico-mineral.

Ao Lauro Luchesi e a empresa Corn Products pela doação do amido de milho.

À FAPESP pela bolsa concedida no mestrado.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço primeiramente aos meus Pais, Sérgio e Regina, por terem me dado todas as condições possíveis para me tornar uma pessoa capaz de se desenvolver profissionalmente, pela confiança dada nesses dez anos longe de nossa casa e pelos ensinamentos a respeito da conduta social e moral, que faz evoluir a cada dia meus preceitos de respeito ao próximo.

Manifesto grande gratidão aos meus avós, meu irmão Gustavo e à Marlene, à Béia, ao Caio, ao Tio Nico e à Tia Jane por formarem e cuidarem de nossa “grande” família.

Aos meus “irmãos republicanos jaboticabalenses”, Loro, Serginho, Lepra, Anderson, Juan, Ricardo, Mineo, Lingüiça, Beto, Daniel, Maricy, Fernanda, Denise e Gabi, agradeço pelos churrascos, pelas bebedeiras e por todas as coisas que esqueci.

Aos meus amigos de Santos e São Paulo, Daniel, Valdo, Kosha, Dog, Vivi, Boca, Sho, Clarissa e especialmente a Karla, agradeço pelo carinho e pelas estadias no Clube 171. Me desculpem por não estar presente em momentos memoráveis, ou por estar...”Quem é que sabe?!”

Aos meus companheiros “lageanos” da Boate Azul, que apesar da distância me faz lembrar todos os dias como era boa a companhia de vocês.

Aos meus amigos e sócios do Spécialité – Diagnóstico Veterinário, Max, Fernanda e Patrícia, agradeço pela confiança e principalmente pela espera.

Aos alunos da FCAV-UNESP, em especial a Poxete, Lia, Ferrugem, Pira, Lia, Rita e Monique.

Aos companheiros veterinários que trabalhei e que trabalho, agradeço pela estimada amizade.

A minha cadela Raiska agradeço pelo enorme companheirismo e confiança. Desculpe ficar longe de você por longos períodos.

Ao Santos Futebol Clube por ter me tornado Bicampeão Brasileiro e Campeão Paulista em minha jornada jaboticabalense.

Dedico ao meu Pai, que soube da melhor forma possível, me direcionar no caminho da Medicina Veterinária preconizando os conceitos básicos de ética profissional e social.

“Uma estória verdadeira é mais rapidamente passada adiante quando contada de forma simples”

Shakespeare

“Richard III”

“Tudo deve ser tornado o mais simples possível, mas não mais simples do que é”

Albert Einstein

“Deixar que os fatos sejam fatos naturalmente, sem que sejam forjados para acontecer. Deixar que os olhos vejam pequenos detalhes lentamente. Deixar que as coisas que lhe circundam estejam sempre inertes, como móveis inofensivos, para lhe servir quando for preciso e nunca lhe causar danos morais, físicos ou psicológicos.”

Chico Science e Jorge Du Peixe

Da música “Corpo de lama”

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE QUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	x
SUMMARY	xi
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Astrócitos	3
2.1.1 Morfologia	3
2.1.2 Função dos astrócitos	3
2.1.3 Imunorreatividade	5
2.2 Encefalomalácia Nutricional	6
III. OBJETIVOS	11
IV. MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1 Animais.....	12
4.2 Instalações	12
4.3 Experimentos	12
4.3.1 Experimento 1 (E1)	13
4.3.2 Experimento 2 (E2)	15
4.3.3 Experimento 3 (E3)	17
4.4 Avaliação clínica dos animais	20
4.5 Eutanásia	21
4.6 Exame necroscópico	21
4.7 Exame histopatológico	21
4.8 Exame imunoistoquímico	21

4.9 Avaliação da distribuição dos astrócitos no encéfalo de <i>Gallus gallus domesticus</i>	24
4.10 Avaliação do comportamento dos astrócitos na patogenia de casos naturais de Encefalomalácia Nutricional	24
V. RESULTADOS	23
5.1 Experimento 1 (E1)	25
5.2 Experimento 2 (E2)	28
5.3 Experimento 3 (E3)	29
5.3.1 Grupos experimentais - alterações clínicas e anatomopatológicas	29
5.3.2 Média da massa dos animais dos grupos experimentais	34
5.3.3 Análise quantitativa da vitamina E nas rações.....	34
5.3.4 Análise qualitativa e quantitativa da oxidação dos óleos vegetais e animais utilizados como fonte de gordura.....	35
5.4 Distribuição dos astrócitos em encéfalos de <i>Gallus gallus domesticus</i> hígidos	35
5.5 Avaliação dos casos naturais de Encefalomalácia Nutricional.....	38
5.5.1 Aspectos clínicos-epidemiológicos	38
5.5.2 Alterações histopatológicas.....	40
5.5.3 Avaliação do comportamento dos astrócitos na patogenia da Encefalomalácia Nutricional.....	41
VI. DISCUSSÃO	45
6.1 Indução da Encefalomalácia Nutricional utilizando-se uma ração deficiente em vitamina E.....	46
6.2 Casos naturais de Encefalomalácia Nutricional – Características clínicas-epidemiológicas e lesões anatomopatológicas.....	49
6.3 Protocolo imunistoquímico para a detecção de astrócitos no SNC de <i>Gallus gallus domesticus</i>	51
6.4 Avaliação do comportamento dos astrócitos na patogenia da Encefalomalácia Nutricional em <i>Gallus gallus domesticus</i>	53

6.5 Considerações finais.....	56
VII. CONCLUSÕES.....	57
VIII. REFERÊNCIAS	58
IX. APÊNDICES	66
Apêndice 01 - Gráficos das médias da massa das aves nos grupos experimentais do E3	66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

kg – Quilograma
mg – Miligrama
 μL – Microlitro
mL – Mililitro
 μm – Micrômetro
% - Porcentagem
°C – Graus Celsius
ABC – Complexo Avidina-Biotina
CAV – Centro de Ciências Agroveterinárias
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAB - Diaminobenzidina
E1 – Experimento 1
E2 – Experimento 2
E3 – Experimento 3
EN – Encefalomalácia Nutricional
FCAV – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
GA – Grupo A do E2
GABA – Ácido Gama-Aminobutírico
GB – Grupo B do E2
GFAP – Proteína Glial fibrilar Ácida
SNC – Sistema Nervoso Central
UDESC – Universidade de Estado de Santa Catarina
UI – Unidade Internacional
UNESP – Universidade Estadual Paulista

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 01. Composição da ração fornecida aos animais no período de 01-21 dias de idade (fase inicial) no E1	13
Tabela 02. Composição da ração fornecida aos animais no período de 22-42 dias de idade (fase final) no E1	13
Tabela 03. Composição da ração fornecida aos animais no período de 01-21 dias de idade (fase inicial) no E2	15
Tabela 04. Composição da ração fornecida aos animais no período de 22-42 dias de idade (fase final) no E2.....	16
Tabela 05. Composição da ração fornecida aos animais no E3.....	18
Tabela 06. Quantidade de óbitos naturais e eutanásias nos animais, em seus respectivos grupos, antes do abate dos animais aos 42 dias de idade.....	30
Tabela 07. Análise quantitativa e qualitativa dos óleos oxidados utilizados no E3.....	34
Tabela 08. Análise quantitativa e qualitativa dos óleos oxidados utilizados no E3.....	35
Tabela 09: Aspectos clínicos – epidemiológicos dos casos naturais de Encefalomalácia Nutricional avaliados.....	39

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 01. Composição do suplemento vitamínico-mineral utilizado na fase inicial do E1. Níveis de garantia por kg do produto.....	14
Quadro 02. Composição do suplemento vitamínico-mineral utilizado na fase final do E2. Níveis de garantia por kg do produto.....	14
Quadro 03. Composição do suplemento vitamínico-mineral adicionado na dieta dos animais na fase inicial, ao GA e GB. Níveis de garantia por kg do produto.....	16
Quadro 04. Composição do suplemento vitamínico-mineral adicionado na dieta dos animais na fase final, ao GA e GB. Níveis de garantia por kg do produto.....	17
Quadro 05. Composição do suplemento vitamínico-mineral adicionado na dieta dos animais do E3. Níveis de garantia por kg do produto.....	18

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 01. Equipamento utilizado para a oxidação dos óleos. C – compressor de ar; T – termômetro de alta temperatura; E – ebulidor; Cu – cano de cobre.....	19
Figura 02. Esquema representativo das regiões do encéfalo onde foi analisada a distribuição dos astrócitos. A - Córtex cerebral; B – Lobos ópticos; C - Cerebelo; D - Corte longitudinal do encéfalo....	23
Figura 03. Ave apresentando apatia e paresia de membros pélvicos.....	25
Figura 04. Encéfalo apresentando ausência de lesões. Ave - E1.....	26
Figura 05. Corte longitudinal do encéfalo, na linha mediana, demonstrando ausência de lesões. Ave - E1.....	26
Figura 06. Fotomicrografia do cerebelo com ausência de lesões na substância branca e cinzenta. HE. Obj.10X. Ave - E1.....	27
Figura 07. Fotomicrografia do cérebro com ausência de lesões na em células nervosas e endoteliais. HE. Obj.20X. Ave - E1.....	27
Figura 08. Pintinhos do GA com uma semana de idade sem sinais clínicos da Encefalomalácia Nutricional.....	28
Figura 09. Frangos do GA com cinco semanas de idade sem sinais clínicos da Encefalomalácia Nutricional.....	29
Figura 10. Aves do G09, com 42 dias de idade, apresentando desuniformidade, estado nutricional ruim, apatia, depressão e estiramento de membros.....	31
Figura 11. Ave do G09, com 36 dias de idade, apresentando decúbito lateral, caquexia e estiramento de membros.....	31

Figura 12. Frango do G09 apresentando palidez e hemorragia na musculatura da coxa e edema subcutâneo (*).....	32
Figura 13. Frango do G09 apresentando palidez e hemorragia na musculatura peitoral e edema subcutâneo generalizado.....	32
Figura 14. Fotomicrografia de músculo esquelético apresentando degeneração (seta) e calcificação de miofibras (*), além de infiltrado inflamatório heterofílico. HE. Obj. 40X. G09.....	33
Figura 15. Fotomicrografia de músculo esquelético apresentando área de degeneração e necrose de miofibras (*). HE. Obj. 20X. G09.....	33
Figura 16. Fotomicrografia de córtex cerebral demonstrando a presença de astrócitos na camada subependimária (seta). Anti-GFAP. 40X.....	37
Figura 17. Fotomicrografia de córtex cerebral demonstrando os astrócitos margeando os ventrículos laterais (*). Anti-GFAP. 40X.....	37
Figura 18. Fotomicrografia de córtex cerebral demonstrando os astrócitos formando a barreira hemato-encefálica (seta). Anti-GFAP. 40X....	38
Figura 19. Fotomicrografia de cerebelo apresentando malácia na substância branca (*). HE. Obj. 10X.....	40
Figura 20. Fotomicrografia de córtex cerebral apresentando malácia (*) com presença de trombose em capilares. HE. Obj. 10X.....	41
Figura 21. Fotomicrografia de cerebelo apresentando astrogliose e astrocitose adjacente à área de vacuolização na substância branca (*). Anti-GFAP. Obj. 4X.....	42
Figura 22. Fotomicrografia de córtex cerebral apresentando astrogliose e astrocitose adjacente à área de vacuolização na substância branca. Anti-GFAP. Obj. 40X.	42
Figura 23. Fotomicrografia de cérebro demonstrando astrogliose e astrocitose adjacente à área de malácia (*). Anti-GFAP. Obj. 40X.....	43

Figura 24. Fotomicrografia de colículo demonstrando astrogliose e astrocitose adjacente á meningite mononuclear. Anti-GFAP. Obj. 4X.....	43
Figura 25. Fotomicrografias de córtex cerebral demonstrando astrogliose e astrocitose perivascular acentuada. Anti-GFAP. Obj. 20X.....	44

ENCEFALOMALÁCIA NUTRICIONALEM *Gallus gallus domesticus*. ESTUDO SOBRE A PARTICIPAÇÃO DE ASTRÓCITOS NA PATOGENIA.

RESUMO – Os astrócitos são células nervosas que participam da patogenia de diversas neuropatias que acometem os animais domésticos. Nas aves, a principal doença neurológica é a Encefalomalácia Nutricional causada pela deficiência de vitamina E. Com o objetivo de se estudar o comportamento do astrócitos, pelo exame imunoistoquímico, na patogenia da Encefalomalácia Nutricional em *Gallus gallus domesticus*, foi realizada a tentativa de indução desta doença. Utilizou-se para isto rações contendo deficiência de vitamina E no suplemento vitamínico-mineral e fontes de gordura oxidadas. Nos experimentos realizados não se obteve sucesso na indução da Encefalomalácia Nutricional, porém, em casos naturais reavaliados, constatou-se que os astrócitos participam na patogenia apresentando astrogliose e astrocitose nas áreas lesionadas e ao redor de vasos sanguíneos (barreira hemato-encefálica). Portanto, conclui-se que os astrócitos participam na patogenia da Encefalomalácia Nutricional em *Gallus gallus domesticus* e que, a etiologia da doença não é atribuída somente à deficiência de vitamina E na dieta.

Palavras-chave: Astrócitos, Encefalomalácia Nutricional, *Gallus gallus domesticus*, Imunoistoquímica, Neuropatologia, Vitamina E

**NUTRICIONAL ENCEPHALOMALACIA IN *Gallus gallus domesticus*.
PARTICIPATION OF ASTROCYTES IN THE PATHOGENESIS.**

SUMMARY – The astrocytes are nervous cells which participate in the pathogenesis of various neuropathies of domestic animals. In poultry, the main neurologic disorder is Nutricional Encephalomalacia, caused by vitamin E deficiency. With the aim to study the behavior of astrocytes in the Nutricional Encephalomalacia pathogenesis in *Gallus gallus domesticus*, by immunohistochemistry, a trial of induction of the disorder was realized. Low vitamin E and oxidized oil rations were prepared. There was no success in the experimental induction of Nutricional Encephalomalacia, however, in re-evaluated naturally occurring cases, it could be observed that astrocytes undergo astrogliosis and astocytosis in the lesioned area and around blood vessels (hemato-encephalic barrier). Altogether, it may be concluded that astrocytes participate in the pathogenesis of the poultry's Nutricional Encephalomalacia, and that the disorder is not only caused by diets with the lack of vitamin E.

Keywords: Astrocytes, Nutricional Encephalomalacia, *Gallus gallus domesticus*, Immunohistochemistry, Neuropathology, Vitamin E

I INTRODUÇÃO

Astrócitos são células nervosas, não-neuronais, pertencentes à macroglia, que desempenham várias funções no Sistema Nervoso Central (SNC) normal e também em processos patológicos. Entre estas se destacam a proliferação e a hipertrofia – astrocitose e astrogliose, a fagocitose e a reparação tecidual.

Os astrócitos podem ser observados histologicamente pelo método desenvolvido por Ramon Y Cajal (1913), utilizando-se cloreto de ouro sublimado, porém, após a descoberta da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), um filamento intermediário que compõe o citoesqueleto astrocitário, técnicas imunoenzimáticas vêm sendo aplicadas para sua identificação.

Exames imunistoquímico e imunocitoquímico, com a utilização de anticorpos anti-GFAP, permitem a observação da distribuição e a reação de astrócitos em diversas regiões do SNC de animais sadios ou apresentando doenças. Ademais, freqüentemente anticorpos anti-GFAP são utilizados no diagnóstico de neoplasias do SNC em animais e humanos.

Na Medicina Veterinária, já se estudou a distribuição e o comportamento dos astrócitos imunorreativos a GFAP no SNC de bovinos acometidos pela Raiva ou Herpesvirose, em eqüinos apresentando Leucoencefalomalácia, em caninos com Cinomose e Meningoencefalomielite Granulomatosa e em suínos afetados pela Doença de Aujeszky, Meningite Estreptocócica ou Peste Suína Clássica, concluindo-se que há relação entre o comportamento dos astrócitos e a patogenia das doenças supracitadas.

Experimentalmente, astrócitos imunorreativos a GFAP, em diferentes regiões do SNC, foram mapeados em *Gallus gallus domesticus* hígidos (KALMAN et al., 1993; SHIN et al., 2003), porém não há relatos do comportamento desta célula glial em encefalopatias aviárias.

A Encefalomalácia Nutricional (EN), descrita em aves, é a doença que acomete o SNC mais freqüentemente diagnosticada, e uma das que trazem maior

prejuízo a criadores e agroindústrias, devido aos custos de tratamento e aos altos índices de morbidade e mortalidade.

O Brasil é atualmente o maior produtor e exportador de carne aviária do mundo. Como a EN tem uma etiologia nutricional, é muito importante o controle desta para que não haja perda de investimentos do mercado externo devido ao aumento do custo de criação.

A etiologia da EN é atribuída à deficiência de vitamina E na dieta. Sua patogenia não está totalmente estabelecida, mas sabe-se que ocorre uma série de alterações bioquímicas no SNC que acarreta em lesões, principalmente no cerebelo, gerando sinais clínicos neurológicos.

Logo, foi realizada a tentativa de indução da EN, utilizando-se dietas com deficiência de vitamina E e diferentes fontes de gordura, a fim de se estabelecer um modelo experimental para o estudo da doença.

Não há trabalhos onde é descrita a atuação dos astrócitos na patogenia da EN, portanto, nessa pesquisa sugeriu-se a avaliação do comportamento destas células, a fim de ser aplicada no estudo de neuropatias similares que afetam animais e seres humanos.

II REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Astrócitos

2.1.1 Morfologia

Os astrócitos são células do SNC consideradas não-neuronais, pertencentes à macroglia, que são classificados baseado na sua morfologia em dois tipos principais: fibrosos (tipo I) e protoplasmáticos (tipo II) (ANDRIENZEN apud ABBOTT, 1991).

Tanto os astrócitos fibrosos como os protoplasmáticos apresentam formato estrelado, com núcleo grande e ovalado, que são levemente corados pela hematoxilina, contendo nucléolos pouco evidentes. O citoplasma usualmente não é perceptível na coloração hematoxilina-eosina (STORTS, 1998).

A diferença entre os dois tipos de astrócitos está baseada nos prolongamentos citoplasmáticos e em sua localização no SNC, sendo que os astrócitos fibrosos apresentam prolongamentos citoplasmáticos delgados, pouco ramificados e longos, e localizam-se principalmente na substância branca do SNC. Por sua vez, os protoplasmáticos exibem prolongamentos citoplasmáticos espessos, muito ramificados e curtos, e estão presentes principalmente na substância cinzenta do SNC (SUMMERS et al., 1995).

Os prolongamentos citoplasmáticos, de ambos os tipos de astrócitos, entram em contato com vasos sanguíneos, pelos “pés terminais”, para formar a barreira hemato-encefálica, ou se estendem à superfície do SNC, compondo a glia limitante externa (PETERS et al. 1991).

2.1.2 Funções dos astrócitos

Muitas funções são atribuídas aos astrócitos, tanto no desenvolvimento e funcionamento do SNC, como nas respostas às injúrias do SNC.

No desenvolvimento do SNC, os processos citoplasmáticos longos das células radiais da glia, que são precursoras dos astrócitos, direcionam os neurônios para o cerebelo, hipocampo e córtex, além de orientar os axônios neuronais de um hemisfério cerebral ao outro pelo corpo caloso (SUMMERS et al., 1995).

Os “pés terminais” dos prolongamentos astrocitários revestem capilares sangüíneos, induzindo a formação da barreira hemato-encefálica, que seleciona a penetração de moléculas no SNC (MACHADO, 2002).

Demais funções conferidas aos astrócitos estão relacionadas com a homeostase e a transmissão de impulsos nervosos. Estes controlam os níveis de potássio e o pH extraneuronal, ademais, os prolongamentos citoplasmáticos dos astrócitos sustentam e isolam sinapses neuronais, permitindo a transferência seletiva de neurotransmissores na fenda sináptica (SUMMERS et al., 1995; DONG e BENVENSITE, 2001; MACHADO, 2002). Ransom et al. (2003) também estabelecem que os astrócitos removem o glutamato e o neurotransmissor GABA da fenda sináptica além de sintetizar os precursores dessas substâncias.

Os astrócitos reagem à agressão no SNC de diversas formas, sendo a principal a astrocitose, ou seja, a proliferação destas células (VASCONCELOS, 2003).

Outras formas de manifestação dos astrócitos, perante a injúrias no SNC, seria a astrogliose, ou seja, hipertrofia tanto do citoplasma quanto do núcleo celular (STORTS, 1998), a fagocitose de axônios degenerados (WATANABE et al., 1989) e a ocupação de áreas de malácia com a finalidade de cicatrização (MACHADO, 2002). Ransom et al. (2003) sugerem que os astrócitos direcionam os neurônios ao local da injúria e também expressão de conexinas na área lesionada.

Quanto à imunidade do SNC, os astrócitos cumprem funções importantes expressando citocinas e quimiocinas que coordenam a migração e a ativação de leucócitos ao SNC (DORF et al., 2000; RANSOM et al., 2003).

Algumas funções dadas aos astrócitos ainda são debatidas por pesquisadores. Porém, Ransom et al. (2003) propõem que eles, fisiologicamente, modulam as fases excitatórias e inibitórias da sinapse, regulam o início da sinapse e detoxificam o SNC de radicais livres. Em um estado patológico, estes autores sugerem que os astrócitos geram um tropismo para a reparação e crescimento axonal após injúria nos neurônios.

2.1.3 Imunorreatividade

Métodos tradicionais de coloração e identificação de astrócitos desenvolvidos por Ramon Y Cajal (1913), utilizando cloreto de ouro sublimado, foram substituídos por procedimentos imunoistoquímicos.

Com o avanço nas pesquisas na área da imunistoquímica, alguns pesquisadores denotaram que existem antígenos característicos e restritos nos astrócitos, entre eles a proteína S-100 (BOYES et al., 1986) e a GFAP (PFEIFFER et al., 1992).

A GFAP, primeiramente descrita por Eng et al. (1971), é um filamento intermediário que compõe o citoesqueleto, tendo sua função relacionada com a interconexão da membrana citoplasmática à carioteca, interagindo também com microtúbulos e microfilamentos.

Bignami e Dahl (1974) comprovaram que a GFAP era específica dos astrócitos, e que poderia ser ligada a anticorpos anti-GFAP.

A partir dos estudos de Eng et al. (1971) e Bignami e Dahl (1974), começaram a ser utilizados anticorpos anti-GFAP para a identificação de astrócitos imunorreativos em diversas regiões do SNC, e nas reações astrocitárias frente a várias doenças.

Na Medicina Veterinária, estudam-se tanto a distribuição de astrócitos imunorreativos a GFAP em animais hígidos como em enfermos.

Hajós e Kálmám (1989), observaram astrócitos imunorreativos em ratos normais, caracterizando sua distribuição em diversas regiões do cérebro. McDermott e Lantos (1989) e Machado et al. (1993), relataram estudos similares em *Callithrix jacchus* neonatos e em suínos, respectivamente.

Experimentalmente, Alessi (1991) sugeriu que os astrócitos têm uma participação na patogenia da Encefalomielite Murina de Theiler, mantendo o vírus no SNC e modulando a resposta imune, tendo-se em vista a astrocitose observada perante anticorpos anti-GFAP.

Nas pesquisas de Machado e Alessi (1997) foi observada a imureatividade astrocitária a GFAP, em determinadas regiões do SNC, em bovinos hígidos e infectados com o vírus da Raiva, concluindo que há participação dos astrócitos no curso da Raiva, bem como há variação na densidade celular em diferentes regiões do SNC.

Pedraza Ordóñez (2003) verificou que há astrogliose e astrocitose em determinadas áreas do SNC de bovinos acometidos pela Encefalite por Herpesvírus tipo-5, concluindo que estas células apresentam papel importante na reação inflamatória frente a esta doença.

Equínos com Leucoencefalomalácia, nos estudos dirigidos por Lemos e Alessi (1999), apresentaram alterações morfológicas nos astrócitos imunorreativos a GFAP localizados nas áreas de malácia, bem como nas adjacências das lesões, corroborando que estas células apresentam papel importante na patogenia desta doença.

Astrocitose, em cães com Cinomose (JARDIM et al., 2001) e em camundongos infectados com o vírus da Estomatite Vesicular (MACHADO, 1999; MAZZUCATO e ALESSI, 2001; VASCONCELOS, 2003), observada na imunorreatividade de astrócitos anti-GFAP, corrobora a sua participação na patogenia de infecções virais.

Kalman et al. (1993), foram os primeiros pesquisadores a mapearem os astrócitos imunorreativos a GFAP em galinhas adultas. Em pesquisa posterior, Kalman et al. (1993) observaram a distribuição dos astrócitos no SNC de aves domésticas desde o nascimento até a fase adulta.

Ademais, Virgintino et al. (1992) e Shin et al. (2003), em suas pesquisas, caracterizaram a distribuição de astrócitos no *tectum* óptico de aves domésticas normais utilizando técnicas imunoistoquímicas.

Cameron-Curry et al. (1991), observaram a distribuição astrocitária no SNC de codornas japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) utilizando anticorpos anti-GFAP para sua identificação.

2.2 Encefalomalácia Nutricional

A EN é uma doença causada pela deficiência de vitamina E, que acomete principalmente pintainhos de linhagem de corte (*Gallus gallus domesticus*) entre quinze a trinta dias de idade (CHEVILLE, 1994; AUSTIC e SCOTT, 1997; JONES et al., 2000; de FARIA e JUNQUEIRA, 2000).

Entre as doenças do SNC em pintainhos, a EN é a que ocorre com maior frequência (57%), seguida da Encefalomalácia Neonatal (22%) e da Meningoencefalite Séptica (16%) (GOODWIN et al., 1996).

A EN é comumente diagnosticada em frangos de cortes jovens. Entretanto, há raros relatos da doença em perus (JORTNER et al, 1985; KLEIN et al, 1994; AUSTIC e SCOTT, 1997), periquitos australianos jovens (HASHOLT e PETRAK, 1982), matrizes de linhagem de corte com trinta e cinco semanas de idade (PAGE et al., 1981), suínos acometidos pela Doença do Coração de Amora, caninos, ratos, símios, eqüinos selvagens mongóis e humanos (JONES et al., 2000).

A deficiência de vitamina E também pode provocar alterações em outros sistemas do organismo. Segundo Jordão-Jr et al (1998), os animais podem

apresentar aborto, degeneração testicular, distrofia muscular, cardiomiopatias, hemólise eritrocítica e necrose hepática devido à deficiência de vitamina E.

As causas da deficiência da vitamina E na dieta podem ser variadas. A oxidação de ácidos graxos, incorreção da mistura e níveis inadequados de vitamina E na ração (BAINS, 1979), além da ausência de antioxidantes sintéticos (de FARIA e JUNQUEIRA, 2000) e a instabilidade da vitamina E que ocorre devido a longos períodos de armazenamento em navios (WILSON et al, 1978) predispõem ao surgimento de sintomas neurológicos da EN.

Viott et al. (2003) observaram que a criação orgânica de frangos, infectados por coccídeos no trato intestinal, reduziu a absorção da vitamina E, já que esta é absorvida sob a forma não esterificada no intestino delgado (JORDÃO-JR et al, 1998).

Experimentalmente, a utilização de dietas com ausência ou deficiência de vitamina E associada com óleos ricos em ácido linolêico produzem o quadro clínico-patológico da EN (HAKKAHAINEN et al, 1983; VERICEL et al., 1991; FUHRMANN e SALLMANN, 1995; FUHRMANN et al, 1996; FUHRMANN e SALLMANN, 2000).

Em estudos realizados por Bartov e Bornstein (1972) a adição na ração de óleo de soja, cártamo, girassol ou fígado de bacalhau, oxidados, promove a EN.

A vitamina E, que compõe o grupo dos tocoferóis, é lipossolúvel e encontra-se associada às membranas celulares fosfolipídicas, depósitos de tecido adiposo e as lipoproteínas sangüíneas (NELSON e COX, 2000). No grupo dos tocoferóis, o α -tocoferol é o mais comum no organismo, logo, se atribui a este a equivalência nominativa da vitamina E.

Swenson e Reece apud Evans (1996) citam que a vitamina E foi primeiramente isolada do óleo de germe de trigo em estudos de fertilidade em ratos, em 1923. Devido ao seu papel na fertilidade, a substância foi chamada de tocoferol, que literalmente, significa a substância requerida para assegurar nascimentos normais (JORDÃO-JR et al, 1998).

Suas funções estão relacionadas com a proteção de membranas e organelas celulares pela ação antioxidativa contra radicais livres, principalmente os do grupo peroxila e alcoxila, promovendo assim, proteção dos ácidos graxos

poliinsaturados contra a peroxidação lipídica (KUMAR et al., 1994; NELSON e COX, 2000).

Nesse processo, o α -tocoferol atua, doando um átomo de hidrogênio para os radicais livres, derivados da oxidação de ácidos graxos. Analogamente, o radical livre peroxila oxida a vitamina E, e produz o radical tocoferoxila, que é estável e não propaga a cadeia de peroxidação lipídica (JORDÃO-JR et al, 1998).

As membranas celulares fosfolipídicas possuem ácidos graxos poliinsaturados com ligações duplas entre átomos de carbono, que são vulneráveis a ação de radicais livres oriundos do oxigênio, acarretando numa reação em cadeia autolítica, que resulta em extensa lesão nas membranas celulares, nas mitocôndrias, no retículo endoplasmático e nos lisossomos (KUMAR et al., 1994).

Conforme os estudos de Vannucchi et al (1998), supõem-se que as vitaminas antioxidantes, especialmente a vitamina E, possam inibir a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade para a sua forma mais aterogênica, assim, preservando o endotélio vascular e inibindo doenças vasculares.

Devido à peroxidação lipídica da membrana do endotélio vascular encefálico, há degeneração e necrose de arteríolas no SNC, proporcionando a formação de trombos vasculares, isquemia do tecido adjacente e malácia, resultando nos sinais clínico-patológicos da EN.

Os sintomas neurológicos manifestam-se entre a segunda e quarta semana de idade (REIS, 1967; BAINS, 1979; AUSTIC e SCOTT, 1997; de FARIA e JUNQUEIRA, 2000), porém há relatos do início da sintomatologia em aves domésticas com sete dias de idade (AUSTIC e SCOTT, 1997).

Os sinais clínicos que podem ser observados na doença são: ataxia, andar em círculos, retração da cabeça para baixo, para cima ou lateralmente, rápida contração e relaxamento de pernas, paralisia, prostração e morte (HASHOLT e PETRAK, 1982; JORTNER et al., 1985; KLEIN et al, 1994; de FARIA e JUNQUEIRA, 2000; JONES et al, 2000).

Na necropsia são observadas petéquias no cerebelo (BAINS, 1979; KLEIN et al., 1994; AUSTIC e SCOTT, 1997; de FARIA e JUNQUEIRA, 2000; VIOTT et

al., 2003), edema do encéfalo (BAINS, 1979; PAGE et al., 1981; AUSTIC e SCOTT, 1997; de FARIA e JUNQUEIRA, 2000) e áreas de malácia no cerebelo apresentando coloração amarronzada (BAINS, 1979) ou amarelo-esverdeada (AUSTIC e SCOTT, 1997). Demais regiões do encéfalo como o corpo estriado, o córtex cerebral, a medula oblonga e o mesencéfalo podem sofrer malácia, porém com menor freqüência que no cerebelo (PAPPENHEIMER et al., 1939; AUSTIC e SCOTT, 1997).

No exame histopatológico são visibilizadas hemorragias multifocais (RANDALL et al., 1996), desmielinização da substância branca cerebelar (BAINS, 1979; RANDALL et al., 1996; AUSTIC e SCOTT, 1997; de FARIA e JUNQUEIRA, 2000), malácia principalmente na substância branca do cerebelo com degeneração de neurônios localizados na camada de Purkinje (BAINS, 1979; AUSTIC e SCOTT, 1997), degeneração fibrinóide no endotélio arteriolar (VIOTT et al., 2003), trombose hialina na luz de vasos sangüíneos adjacentes as áreas de malácia (KLEIN et al., 1994; RANDALL et al., 1996; AUSTIC e SCOTT, 1997) e edema perivascular (AUSTIC e SCOTT, 1997).

Sandback et al. (1980), induzindo casos crônicos de EN, observaram cicatrização cerebelar com proliferação de membranas basais entre astrócitos e células gliais adjacentes aos vasos sangüíneos.

III OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

- Induzir experimentalmente a EN em *Gallus gallus domesticus* administrando uma dieta deficiente em vitamina E.
- Desenvolver um protocolo imunistoquímico para a identificação de astrócitos no SNC de aves domésticas com linhagem de corte, utilizando anticorpo primário anti-GFAP bovino produzido em coelho.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a distribuição dos astrócitos no SNC de *Gallus gallus domesticus* hípidos, utilizando o anticorpo primário anti-GFAP.
- Caracterizar a distribuição e a reação de astrócitos no SNC de *Gallus gallus domesticus* apresentando EN, empregando anticorpo primário anti-GFAP.
- Pesquisar o comportamento dos astrócitos ante a patogenia da EN.

IV MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados no experimento pintainhos de linhagem de corte com um dia de idade, os quais foram adquiridos do incubatório da empresa Frango Sertanejo, localizado em Ipiranga-SP. Os animais foram transportados à FCAV-UNESP em veículo apropriado, com controle de temperatura e umidade.

Os animais foram vacinados, no incubatório, contra a Doença de Marek e a Bronquite Infecciosa.

Durante o experimento, as aves foram vacinadas contra a Doença de Gumboro e a Doença de New Castle, conforme os programas de imunização utilizados no Setor de Avicultura e no Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP.

4.2 Instalações

Foram utilizados dois locais para a realização do experimento, sendo um galpão localizado no Setor de Avicultura da FCAV-UNESP, no qual foram realizados o Experimento 1 e o Experimento 2 e outro localizado no Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP, no qual foi realizado o Experimento 3.

Os galpões eram constituídos por boxes, os quais permitiam o acondicionamento de 50 aves. Em cada box havia um comedouro e um bebedouro semi-automático, aos quais os animais tinham acesso a ração e a água à vontade. Além disso, aqueles apresentavam iluminação e ventilação apropriadas para gerar bem-estar aos animais utilizados no experimento.

4.3 Experimentos

Para a indução da Encefalomalácia Nutricional foram desenvolvidos três experimentos distintos, sendo a principal diferença, a constituição da ração fornecida aos animais e os grupos experimentais estabelecidos.

4.3.1 Experimento 1 (E1)

a) Grupo experimental: no E1 foram utilizados 30 animais, que constituíram um único grupo, os quais foram separados de forma uniforme em dois boxes.

b) Dieta: a base da dieta fornecida aos animais, do primeiro ao 21º dia de idade (fase inicial), está descrita na Tabela 01.

Tabela 01: Composição da ração fornecida aos animais no período de 01-21 dias de idade (fase inicial) no E1.

INGREDIENTES	QUANTIDADE (%)
Sorgo	45,60
Farelo de soja	35,9
Farelo de trigo	11,35
Fosfato bicálcico	4,0
Calcário	2,35
Suplemento vitamínico-mineral	0,8

A dieta administrada as aves, do 22º dia ao 42º dia (fase final), está descrita na Tabela 02.

Tabela 02: Composição da ração fornecida aos animais no período de 22-42 dias de idade (fase final) no E1.

INGREDIENTES	QUANTIDADE (%)
Sorgo	43,60
Farelo de soja	38,5
Farelo de trigo	13,30
Fosfato bicálcico	2,5
Calcário	1,5
Suplemento vitamínico-mineral	0,6

O suplemento vitamínico-mineral utilizado na ração fornecida aos animais da fase inicial e da fase final é constituído pelos fármacos e nutrientes descritos nos Quadro 01 e Quadro 02, respectivamente.

Quadro 01: Composição do suplemento vitamínico-mineral utilizado na fase inicial do E1. Níveis de garantia por kg do produto.

ELEMENTOS	QUANTIDADE	ELEMENTOS	QUANTIDADE
Vitamina A	1.500.000 UI	Colina	85 g
Vitamina D3	285.000 UI	Metionina	170g
Vitamina E	0 mg	Ferro	6.300 mg
Vitamina K3	230 mg	Promotor de cresc.	5.4 g
Vitamina B1	115 mg	Cobre	9.400 mg
Vitamina B2	1.150 mg	Manganês	9.400 mg
Vitamina B12	2.000 mcg	Zinco	7.819 mg
Ácido nicotínico	4.800 mg	Iodo	160 mg
Ácido pantotênico	1.240 mg	Selênio	23 mg
Piridoxina	230 mg	Antioxidante	20 g
Biotina	12 mg	Coccidiostático	6.4 g
Ácido fólico	115 mg	Veículo Q.S.P.	1.000 g

Quadro 02: Composição do suplemento vitamínico-mineral utilizado na fase final do E2. Níveis de garantia por kg do produto.

ELEMENTOS	QUANTIDADE	ELEMENTOS	QUANTIDADE
Vitamina A	1.550.000 UI	Colina	84 g
Vitamina D3	267.000 UI	Metionina	185 g
Vitamina E	0 mg	Ferro	6.720 mg
Vitamina K3	200 mg	Promotor de cresc.	8,5 g
Vitamina B1	100 mg	Cobre	10.000 mg
Vitamina B2	935 mg	Manganês	10.200 mg
Vitamina B12	2.340 mcg	Zinco	8.418 mg
Ácido nicotínico	4.700 mg	Iodo	170 mg
Ácido pantotênico	1.340 mg	Selênio	24 mg
Piridoxina	170 mg	Antioxidante	20 g
Biotina	14 mg	Coccidiostático	8,5 g

Ácido fólico	100 mg	Veículo Q.S.P.	1.000 g
--------------	--------	----------------	---------

4.3.2 Experimento 2 (E2)

a) Grupos experimentais: o E2 foi constituído por dois grupos experimentais, sendo o Grupo A (GA) composto por 40 aves e o Grupo B (GB) por 20.

As aves de ambos os grupos receberam dieta com a mesma composição, porém, no suplemento vitamínico-mineral incorporado a ração do GA não foi adicionada vitamina E, diferentemente da ração do GB que apresentava vitamina E no suplemento vitamínico-mineral.

Os animais também foram distribuídos, de forma uniforme, em boxes, os quais continham 20 aves cada.

b) Dieta: no E2 os animais também receberam uma dieta balanceada para a fase inicial e uma para a fase final de crescimento, semelhante ao ocorrido no E1.

Nas Tabelas 03 e 04 estão descritas a composição da ração de ambas as fases, respectivamente.

Tabela 03: Composição da ração fornecida aos animais no período de 01-21 dias de idade (fase inicial) no E2.

INGREDIENTES	QUANTIDADE (%)
Amido de milho	40
Farelo de soja	45,101
Sorgo	6,836
Óleo de peixe	4,051
Fosfato bicálcico	2,130
Calcário	0,8

Suplemento vitamínico-mineral	0,5
Sal	0,335
Metionina	0,247

Tabela 04: Composição da ração fornecida aos animais no período de 22-42 dias de idade (fase final) no E2.

INGREDIENTES	QUANTIDADE (%)
Amido de milho	40
Farelo de soja	39,058
Sorgo	9,809
Óleo de peixe	5,0
Fosfato bicálcico	3,09
Metionina	1,2
Lisina	1,0
Suplemento vitamínico-mineral	0,5
Sal	0,35

Os Quadros 03 e 04 descrevem a constituição do suplemento vitamínico-mineral administrado aos animais do GA e do GB, respectivamente.

Quadro 03: Composição do suplemento vitamínico-mineral adicionado na dieta dos animais na fase inicial, ao GA e GB. Níveis de garantia por kg do produto.

ELEMENTOS	QUANTIDADE	ELEMENTOS	QUANTIDADE
Selênio	54,6 mg	Promotor de cresc.	10000 mg
Ácido nicotínico	6930 mg	Vitamina A	1400000 U.I.
Cobre	25000 mg	Vitamina B1	356 g
Pantotenato de cálcio	1900 mg	Vitamina B12	2000 mcg
Biotina	32 mg	Vitamina B2	1920 mg

Manganês	15252 mg	Vitamina B6	693 mg
DL-Metionina	340 g	Vitamina D3	600000 U.I.
Iodo	260 mg	Vitamina K	196 mg
Coccidiostático	25000 mg	Zinco	18250 mg
Antioxidante	100 mg	Vitamina E	0 mg* / 5000 mg**
Colina	120 g		

* GA; ** GB.

Quadro 04: Composição do suplemento vitamínico-mineral adicionado na dieta dos animais na fase final, ao GA e GB. Níveis de garantia por kg do produto.

ELEMENTOS	QUANTIDADE	ELEMENTOS	QUANTIDADE
Selênio	54,6 mg	Promotor de cresc.	10000 mg
Ácido nicotínico	6930 mg	Vitamina A	1400000 U.I.
Cobre	25000 mg	Vitamina B1	356 g
Pantotenato de cálcio	1900 mg	Vitamina B12	2000 mcg
Biotina	32 mg	Vitamina B2	1920 mg
Manganês	15252 mg	Vitamina B6	693 mg
DL-Metionina	270 g	Vitamina D3	600000 U.I.
Iodo	260 mg	Vitamina K	196,5 mg
Coccidiostático	22000 mg	Zinco	18250 mg
Antioxidante	100 mg	Vitamina E	0 mg* / 5000 mg**
Colina	120 g		

* GA; ** GB.

4.3.3. Experimento 3 (E3)

a) Grupos experimentais: o E3 continha 200 aves que foram divididas, uniformemente, em 10 grupos distintos contendo 20 indivíduos cada.

A única diferença entre estes está relacionada com a fonte de gordura incorporada às rações administradas aos animais.

Os grupos experimentais e a fonte de gordura utilizada em suas respectivas rações estão citados abaixo:

- **Grupo 01 (G01):** óleo de frango

- **Grupo 06 (G06):** óleo de peixe oxidado (1)

- Grupo 02 (G02): óleo de frango oxidado
- Grupo 03 (G03): óleo de girassol
- Grupo 04 (G04): óleo de girassol oxidado
- Grupo 05 (G05): óleo de peixe
- Grupo 07 (G07): óleo de soja
- Grupo 08 (G08): óleo de soja oxidado
- Grupo 09 (G09): gordura bovina
- Grupo 10 (G10): óleo de peixe oxidado (2)

b) **Dieta:** administrou-se aos animais do E3 uma dieta composta pelos ingredientes citados na Tabela 05, sendo que a fonte de gordura (óleo) variou conforme os grupos experimentais.

Tabela 05: Composição da ração fornecida aos animais no E3.

INGREDIENTES	QUANTIDADE (%)
Farelo de soja	51,3%
Amido de milho	40%
Óleo	4,0%
Fosfato bicálcico	2,0%
Calcário	1,7%
Suplemento vitamínico-mineral	0,5%
Sal	0,4%
Metionina	0,1%

O Quadro 05 demonstra a constituição do suplemento vitamínico-mineral incorporado às rações dos grupos experimentais.

Quadro 05: Composição do suplemento vitamínico-mineral adicionado na dieta dos animais do E3. Níveis de garantia por kg do produto.

ELEMENTOS	QUANTIDADE	ELEMENTOS	QUANTIDADE
Selênio	54,6 mg	Promotor de cresc.	10000 mg
Ácido nicotínico	6930 mg	Vitamina A	1400000 U.I.
Cobre	25000 mg	Vitamina B1	356 g
Pantotenato de cálcio	1900 mg	Vitamina B12	2000 mcg
Biotina	32 mg	Vitamina B2	1920 mg
Manganês	15252 mg	Vitamina B6	693 mg

DL-Metionina	270 g	Vitamina D3	600000 U.I.
Iodo	260 mg	Vitamina K	196,5 mg
Colina	120 g	Vitamina E	0 mg
Zinco	18250 mg		

Obs: não foram adicionados ao suplemento vitamina E, coccidiostáticos e antioxidantes.

c) Oxidação das fontes de gordura: os óleos utilizados nos G02, G04, G06 e G08 foram aquecidos, em tacho de metal, por 08 horas numa temperatura constante de 250° C. Durante o aquecimento foi injetado ao óleo, oxigênio através de um cano de cobre ligado a um compressor de ar (Figura 01), técnica descrita como aeração térmica.



Figura 01: Equipamento utilizado para a oxidação dos óleos. C – compressor de ar; T – termômetro de alta temperatura; E – ebulidor; Cu – cano de cobre.

d) Análise qualitativa e quantitativa da oxidação dos óleos vegetais e animais utilizados como fonte de gordura: para análise quantitativa da oxidação dos óleos foi utilizado o teste de índice de peróxidos, e para a análise qualitativa foi utilizado o teste de Kreiss.

e) Análise quantitativa de vitamina E nas dietas fornecidas aos animais do E3: a quantidade de vitamina E foi determinada pela cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a qual foi realizada no Laboratório de Análise de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade de Campinas. O limite inferior de detecção e quantificação é resultado da etapa de validação do método de análise.

O limite de detecção do alfa-tocoferol na ração foi estipulado em 15 ng/mL, e o limite de quantificação em 49,5 ng/mL.

O limite de detecção para o delta-tocoferol na ração foi estabelecido em 6,5 ng/mL, e o limite de quantificação em 21,5 ng/mL.

Ficou definido como traços de alfa-tocoferol e delta-tocoferol a presença da substância na dieta, porém com valor abaixo do limite de detecção.

f) Média da massa dos animais dos grupos experimentais: os animais foram pesados, semanalmente, para se avaliar a média da massa de cada grupo.

Para se calcular a média, pesou-se uma amostra de 10 animais de cada grupo, escolhidos aleatoriamente, sendo que o resultado foi dividido por 10.

4.4 Avaliação clínica dos animais

A avaliação dos sintomas clínicos foi realizada diariamente, em dois períodos, no momento em que se fazia a troca da água do bebedouro e se preenchia os comedouros com ração.

As aves eram estimuladas a se movimentarem com a finalidade de se determinar, com maior rigor, a presença de alterações neurológicas características da EN.

Os animais que apresentaram alterações clínicas foram eutanasiados e necropsiados imediatamente após o sacrifício.

As aves encontradas mortas foram necropsiadas logo em seguida.

4.5 Eutanásia

Os animais que não vieram a óbito durante os experimentos foram submetidos à eutanásia pelo método de sangria da veia jugular.

4.6 Exame necroscópico

O exame necroscópico consistiu de uma avaliação macroscópica completa dos órgãos e tecidos, onde foi apreciada a presença ou ausência de lesões.

Os órgãos que apresentaram alterações macroscópicas durante a necropsia e o sistema nervoso central, independentemente de haver lesões, foram colhidos para realização de exame histopatológico.

4.7 Exame histopatológico

Os órgãos colhidos na necropsia foram acondicionados e fixados em solução de formaldeído tamponado com fosfatos a 4%, com pH 7,2 (Formol tamponado com fosfatos a 10%), numa relação líquido/órgão 20:1, por 24 horas.

Após a fixação, os órgãos foram processados conforme rotina convencional de processamento histológico do Laboratório de Histotecnologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP, com desidratação em diluições crescentes de álcoois e diafanização em xilol, para inclusão em blocos de parafina histológica.

Os tecidos foram seccionados em micrótomo numa espessura de 03 μm e foram dispostos em lâminas de vidro contendo um fino esfregaço de Poly-L-Lisina diluída a 0,01%. Subsequentemente, as lâminas foram mantidas em estufa a 60°C por 01 hora e submetidas à desparafinização em xilol e reidratação em diluições decrescentes de álcoois.

Os cortes de tecido foram corados pela hematoxilina e eosina e observados em microscópio óptico.

4.8 Exame imunoistoquímico

Para a identificação da GFAP, foi utilizado o método imuno-enzimático avidina-biotina (ABC) utilizando-se o anticorpo primário policlonal anti-GFAP bovino produzido em coelho¹ e o anticorpo secundário produzido em cabra contra imunoglobulina de coelho². O cromógeno utilizado foi o diaminobenzidina (DAB)³.

As etapas do protocolo imunoistoquímico estão citadas abaixo:

- **Desparafinização e hidratação do tecido:**

- Lâminas contendo cortes histológicos foram mantidos em estufa a 60°C por 40 minutos.
- Passagem por 5 minutos em xilol I, xilol II, álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool 95%, álcool 80%, álcool 70%, álcool 50% e água destilada em temperatura ambiente.

- **Bloqueio da peroxidase endógena:**

- Solução de 97% de álcool metílico + 3% de peróxido de hidrogênio 30 v - 20 minutos em câmara úmida na temperatura ambiente. – Três lavagens com PBS por 5 minutos (lavagem padrão).

- **Recuperação antigênica:**

- Pronase a 5% em PBS - 15 minutos em câmara úmida na temperatura ambiente.
- Lavagem padrão.

- **Bloqueio de proteínas e reações inespecíficas:**

- Leite em pó Molico[®] a 3% em PBS - 20 minutos em câmara úmida na temperatura ambiente.

- **Preparação e adição do anticorpo primário:**

- Diluição de 1:500 em PBS - 03 horas e 30 minutos em câmara úmida entre 2-8°C.
- Lavagem padrão.

1-Dako Z0334; 2-Dako E0432; 3-Kirkegaard & Perry Laboratories 54-10-00

- **Preparação e adição do anticorpo secundário biotinilado:**

- Diluição de 1:300 em PBS – 30 minutos em câmara úmida na temperatura ambiente.
- Lavagem padrão.

- **Preparação e adição do complexo avidina-biotina:**

- Adicionar 10 µL (uma gota) de avidina e 10 µL (uma gota) de biotina em 1,0 mL de PBS. - Preparar a solução 30 minutos antes da aplicação.
- Aplicar por 30 minutos em câmara úmida na temperatura ambiente.
- Lavagem padrão

- **Adição do cromógeno e coloração:**

- Adicionar três gotas de TRIS, duas gotas de peróxido de hidrogênio e duas gotas de DAB em 5 mL de água destilada.
- Retirar os reagentes da geladeira 5 minutos antes do preparo para estabilizarem-se com a temperatura ambiente. Manter em frasco escuro ou âmbar.
- Aplicar durante 30 segundos a um minuto e lavar em água corrente durante 3 minutos.
- Corar com hematoxilina de Harris por 1-2 minutos.

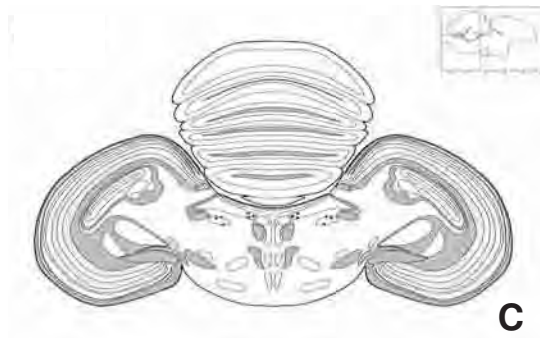
- **Desidratação do tecido e montagem da lâmina:**

- Passagens rápidas (5-10 segundos) em álcool 50%, álcool 70%, álcool 80%, álcool 95%, álcool absoluto, álcool-xilol, xilol I e xilol II, em temperatura ambiente.
- Montagem da lâmina com Bálsamo do Canadá.

4.9 Avaliação da distribuição dos astrócitos no encéfalo de *Gallus gallus domesticus* hípidos

Para a avaliação dos astrócitos no SNC de frangos sadios foram realizados cortes transversais do córtex cerebral, dos lobos ópticos e do cerebelo, e cortes longitudinais do encéfalo (Figura 02).

Para a detecção de astrócitos foi realizado o protocolo imunistoquímico, descrito no item 4.8., utilizando-se um anticorpo primário anti-GFAP bovino produzido em coelho.



B

D

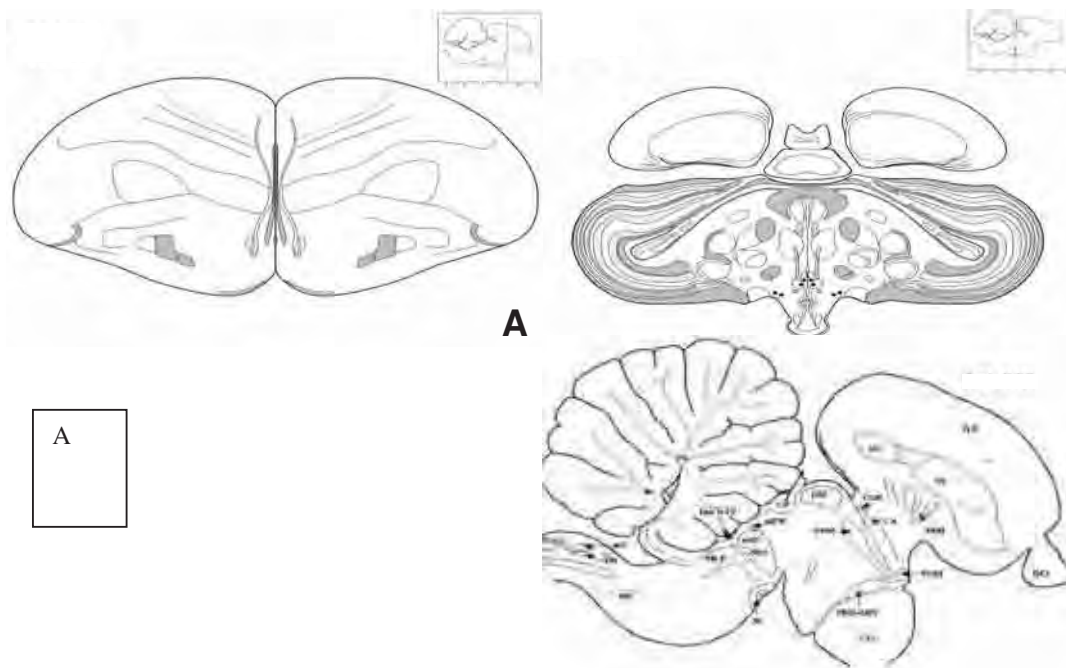


Figura 02: Esquema representativo das regiões do encéfalo onde foi analisada a distribuição dos astrócitos. A - Córtex cerebral; B - Lobos ópticos; C - Cerebelo; D - Corte longitudinal do encéfalo. Fonte: www.avianbrain.org

4.10 Avaliação do comportamento dos astrócitos na patogenia de casos naturais de Encefalomalácia Nutricional

Os arquivos de casos de rotina do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP e do Laboratório de Patologia Animal do CAV-UDESC foram revisados e 12 surtos de EN foram reavaliados.

A reavaliação consistiu na apreciação do histórico clínico-epidemiológico dos surtos, confecção de novas lâminas histológicas a partir de blocos parafinados, descrição das lesões, bem como de sua localização no sistema

nervoso central e realização de exame imunistoquímico para se avaliar o comportamento dos astrócitos na patogenia da doença.

V RESULTADOS

5.1 Experimento 1 (E1)

No E1 os animais não apresentaram alterações clínicas compatíveis com Encefalomalácia Nutricional. Somente um animal, entre 30 aves que formaram o grupo experimental, apresentou apatia e paresia de membros pélvicos (Figura 03).



Figura 03: Frango apresentando apatia e paresia de membros pélvicos.

O animal que apresentou sintomas sofreu eutanásia após 24 horas. As outras 29 aves que formavam o grupo experimental foram sacrificadas aos 42 dias de idade.

Os animais não apresentaram alterações anatomopatológicas, no sistema nervoso central, típicas da Encefalomalácia Nutricional, como pode-se observar nas Figuras 04 a 07.



Figura 04: Encéfalo com ausência de lesões macroscópicas. Ave - E1.



Figura 05: Corte longitudinal do encéfalo, na linha mediana, demonstrando ausência de lesões. Ave - E1.

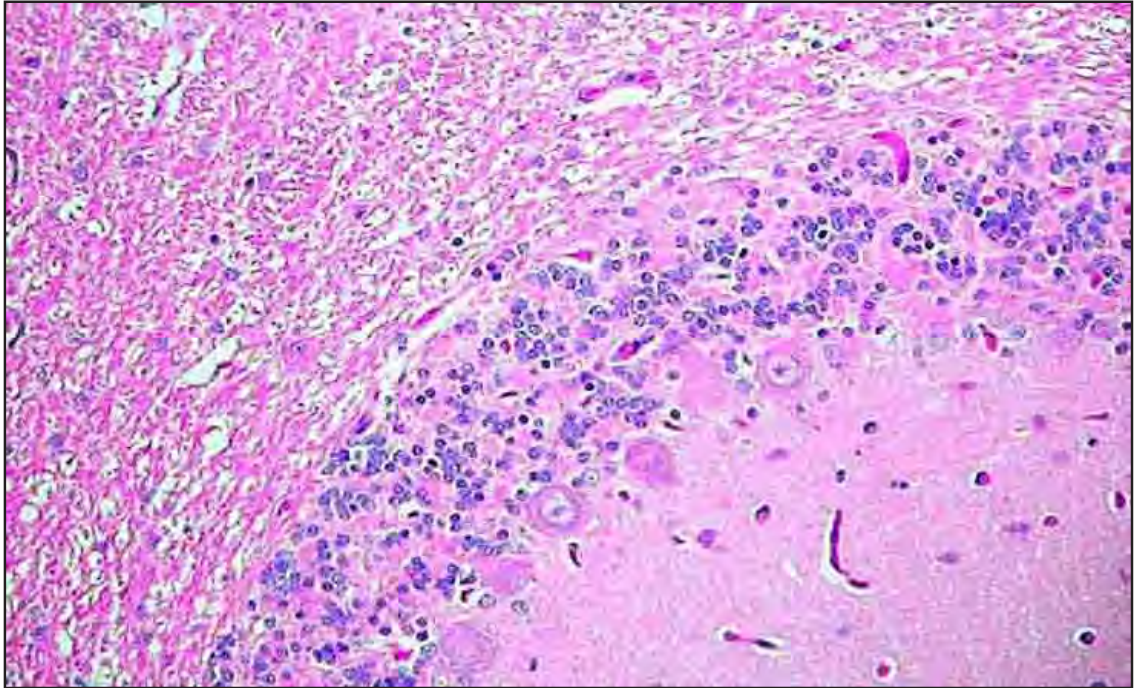


Figura 06: Fotomicrografia do cerebelo com ausência de lesões na substância branca e cinzenta. HE. Obj.10X. Ave - E1.

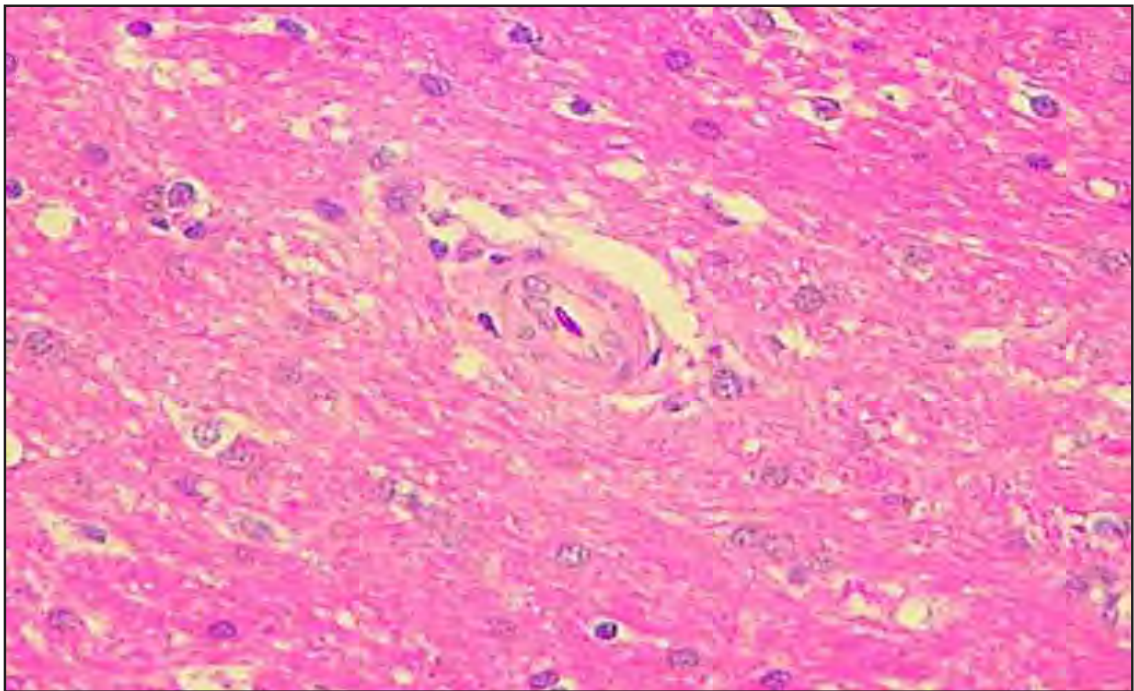


Figura 07: Fotomicrografia do cérebro com ausência de lesões em células nervosas e endoteliais. HE. Obj.20X. Ave - E1.

5.2 Experimento 2 (E2)

No E2, assim como no experimento 1, os animais não apresentaram sintomas compatíveis com Encefalomalácia Nutricional.

Apesar dos animais do GA receberem suplemento vitamínico-mineral com ausência de vitamina E, estes não apresentaram sinais clínicos em nenhuma fase de crescimento (Figura 08 e 09).



Figura 08: Pintinhos do GA com uma semana de idade sem sinais clínicos da Encefalomalácia Nutricional.



Figura 09: Frangos do GA com cinco semanas de idade sem sinais clínicos da Encefalomalácia Nutricional.

As aves do GA e do GB foram sacrificadas e necropsiadas aos 42 dias de idade.

No exame anatomopatológico não foram observadas alterações nos animais de ambos os grupos experimentais.

5.3 Experimento 3 (E3)

5.3.1 Grupos experimentais – alterações clínicas e anatomopatológicas

Não foram observadas alterações clínicas similares às encontradas em casos de Encefalomalácia Nutricional em nenhum dos dez grupos experimentais.

Entretanto, foram constatadas aves com sintomas clínicos variados nos grupos experimentais G03 (óleo de girassol), G05 (óleo de peixe), G08 (óleo de soja oxidado) e no G09 (gordura bovina). Os animais com sinais clínicos foram sacrificados ou tiveram morte natural.

A Tabela 06 demonstra a quantidade de óbitos naturais e/ou eutanásia nas aves, em seus respectivos grupos, antes do abate dos animais aos 42 dias de idade.

Tabela 06: Quantidade de óbitos naturais e eutanásias nos animais, em seus respectivos grupos, antes do abate dos animais aos 42 dias de idade.

Grupos	G01	G02	G03	G04	G05	G06	G07	G08	G09	G10
Óbitos nat.	0/20	0/20	01/20	0/20	01/20	0/20	0/20	03/20	06/20	0/20
Eutanásias	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	03/20	0/20
Total	0/20	0/20	01/20	0/20	01/20	0/20	0/20	03/20	09/20	0/20

Os animais do G09 apresentaram sintomas clínicos característicos da Diátese Exsudativa, doença muscular causada pela deficiência de vitamina E e selênio.

Os sinais clínicos observados foram: apatia, depressão, caquexia, hiporexia, paresia, estiramento de membros e edema na região peitoral (Figuras 10 e 11). O grupo experimental apresentou acentuada desuniformidade no crescimento dos animais.

Na necropsia foram observadas palidez e hemorragia em músculos da coxa (Figura 12) e do peito, edema subcutâneo generalizado (Figura 13) e irregularidade no estado nutricional, caracterizada pela atrofia dos músculos peitorais

No exame histopatológico dos músculos esqueléticos observou-se degeneração, necrose e calcificação de miofibras (Figuras 14 e 15).



Figura 10: Animais do G09, com 42 dias de idade, apresentando desuniformidade, estado nutricional ruim, apatia, depressão e estiramento de membros.



Figura 11: Frango do G09, com 36 dias de idade, apresentando decúbito lateral, caquexia e estiramento de membros.



Figura 12: Frango do G09 apresentando palidez e hemorragia na

musculatura da coxa e edema subcutâneo (*).



Figura 13: Frango do G09 apresentando palidez e hemorragia na musculatura peitoral e edema subcutâneo generalizado.

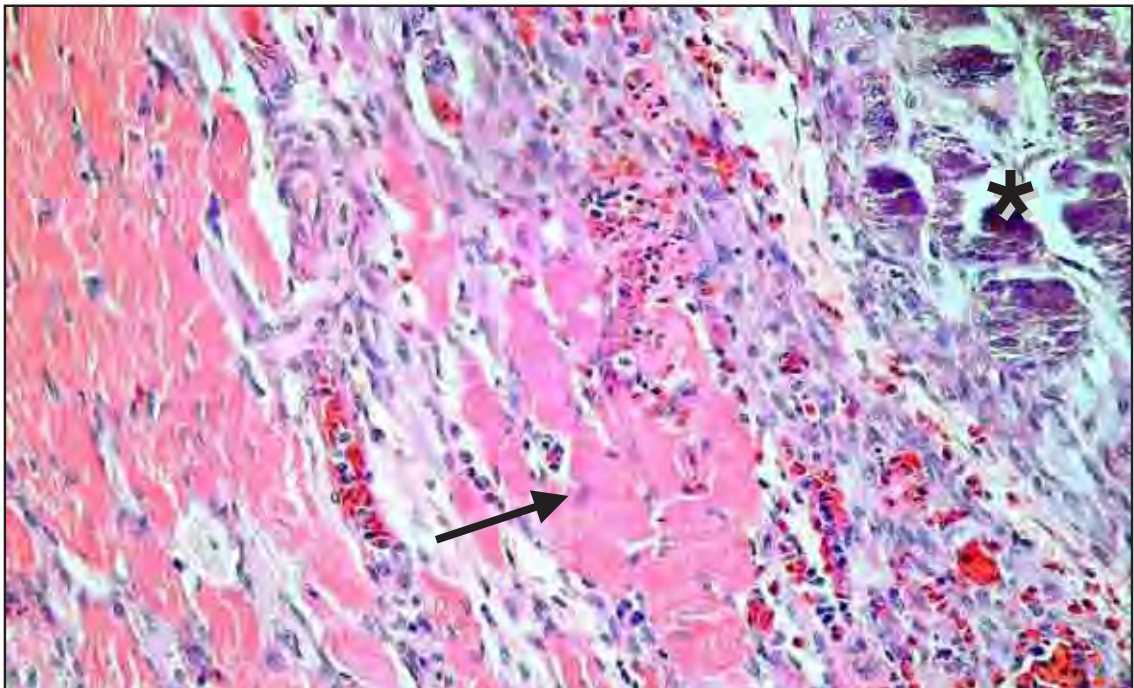


Figura 14: Fotomicrografia de músculo esquelético apresentando degeneração (seta) e calcificação de miofibras (*), além de infiltrado inflamatório heterofílico. HE. Obj. 40X. Ave G09.

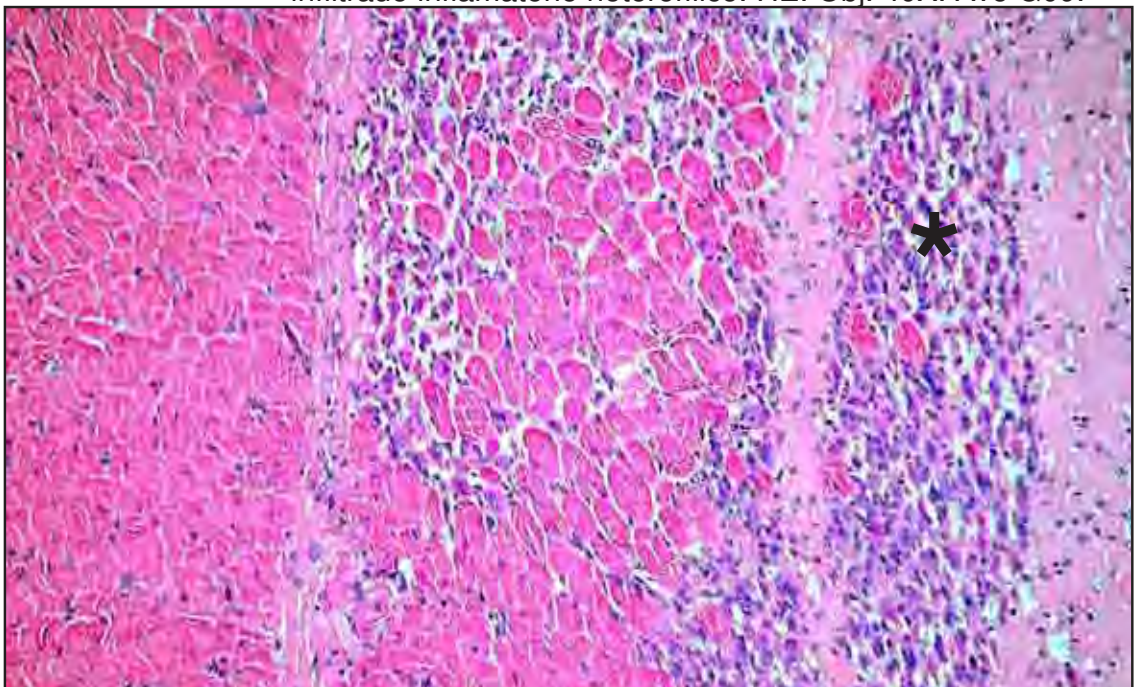


Figura 15: Fotomicrografia de músculo esquelético apresentando área de degeneração e necrose de miofibras (*). HE. Obj. 20X. Ave G09.

5.3.2 Média da massa dos animais dos grupos experimentais

No Apêndice 01 estão ilustrados os gráficos que representa a média da massa dos animais em gramas, nas seis semanas que correspondem ao período do E3, nos dez grupos experimentais.

5.3.3 Análise quantitativa de vitamina E nas rações

A Tabela 07 demonstra a quantidade dos derivados da vitamina E (alfa-tocoferol e delta-tocoferol) aferida pela CLAE nas rações fornecidas aos animais do E3.

Tabela 07: Análise quantitativa e qualitativa da vitamina E nos óleos oxidados utilizados no E3.

RAÇÕES	ALFA-TOCOFEROL	DELTA-TOCOFEROL
Grupo 01	< 49,5 ng/mL	< 21,5 ng/mL
Grupo 02	< 49,5 ng/mL	< 21,5 ng/mL
Grupo 03	< 49,5 ng/mL	< 21,5 ng/mL
Grupo 04	< 49,5 ng/mL	0,0
Grupo 05	< 49,5 ng/mL	0,0
Grupo 06	0,0	0,0
Grupo 07	< 49,5 ng/mL	< 21,5 ng/mL
Grupo 08	0,0	0,0
Grupo 09	0,0	0,0
Grupo 10	0,0	0,0

5.3.4 Análise qualitativa e quantitativa da oxidação dos óleos vegetais e animais utilizados como fonte de gordura

A Tabela 08 demonstra os resultados, qualitativo e quantitativo, da oxidação das fontes de gordura obtidos no teste de Kreiss e pela análise do índice de peróxidos, respectivamente.

Tabela 08: Análise quantitativa e qualitativa dos óleos oxidados utilizados no E3.

FONTE DE GORDURA	TESTE DE KREISS	ÍNDICE DE PERÓXIDOS
Frango (Grupo 02)	Negativo	4,23 mEq/kg
Girassol (Grupo 04)	Positivo	11,79 mEq/kg
Peixe (Grupo 06)	Positivo	11,79 mEq/kg
Soja (Grupo 08)	Positivo	6,51 mEq/kg
Peixe (Grupo 10)	Positivo	11,88 mEq/kg

5.4 Distribuição dos astrócitos em encéfalos de *Gallus gallus domesticus* hípidos

No córtex cerebral notou-se que os astrócitos estão localizados difusamente na glia limitante externa (Figura 16), na glia limitante interna (Figura 17) e formando a barreira hemato-encefálica ao redor de vasos sangüíneos (Figura 18).

Nos lobos ópticos notou-se que os astrócitos estão distribuídos tanto ao redor de vasos sangüíneos, como próximo aos neurônios, em todos os estratos.

No cerebelo os astrócitos localizam-se normalmente na camada granular da substância cinzenta, ao redor de neurônios de Purkinje e difusamente na substância branca, ao redor de vasos sangüíneos e interagindo com neurônios.

Em cortes longitudinais do encéfalo, constatou-se a presença de astrócitos na camada subependimária de todas as regiões, em toda extensão do cerebelo supracitada e no tronco encefálico, próximo a neurônios e núcleos da base.

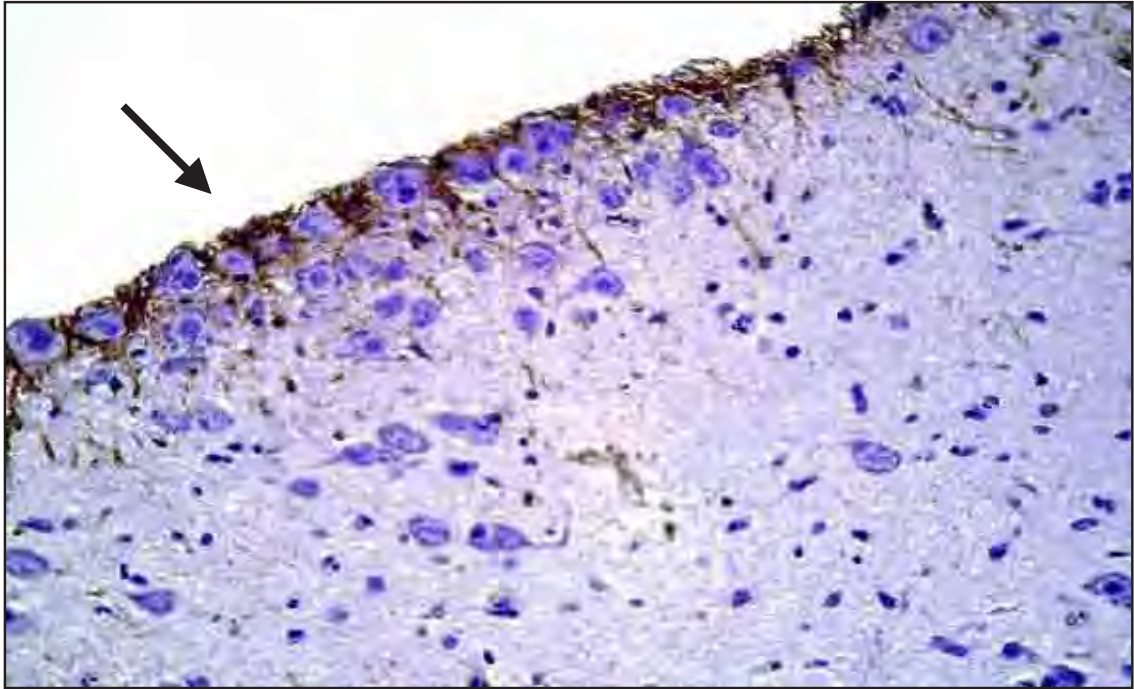


Figura 16: Fotomicrografia de córtex cerebral demonstrando a presença de astrócitos na camada subpial (seta). Anti-GFAP.40X. Ave normal.

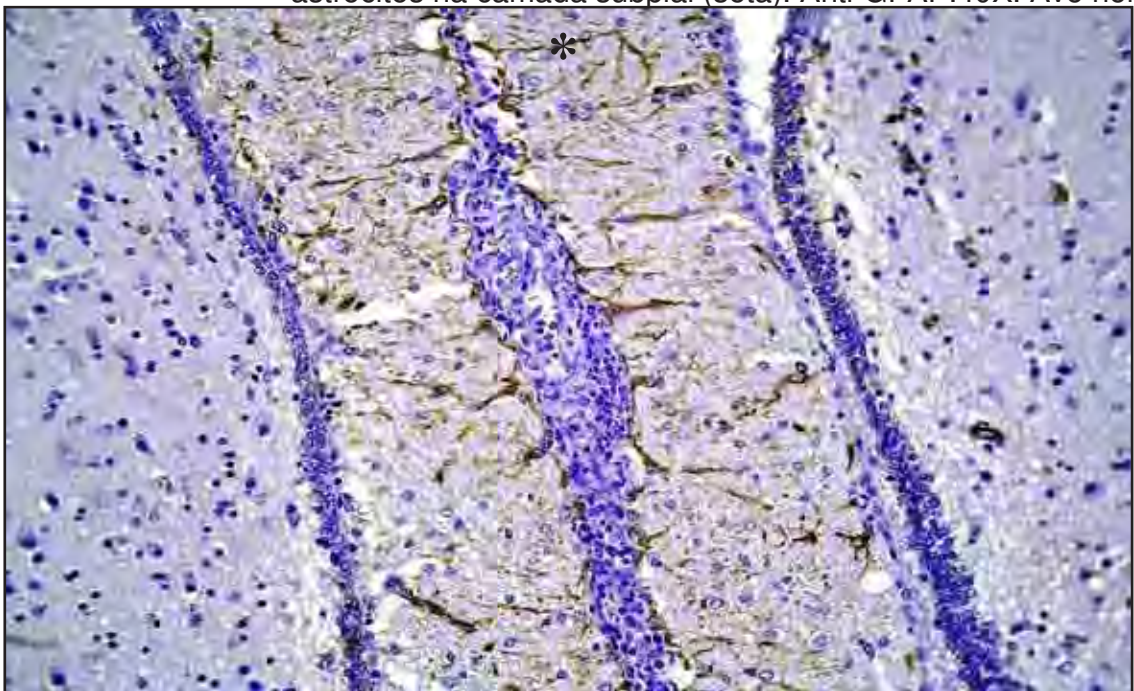


Figura 17: Fotomicrografia de córtex cerebral demonstrando os astrócitos margeando os ventrículos laterais (*). Anti-GFAP.40X. Ave normal.

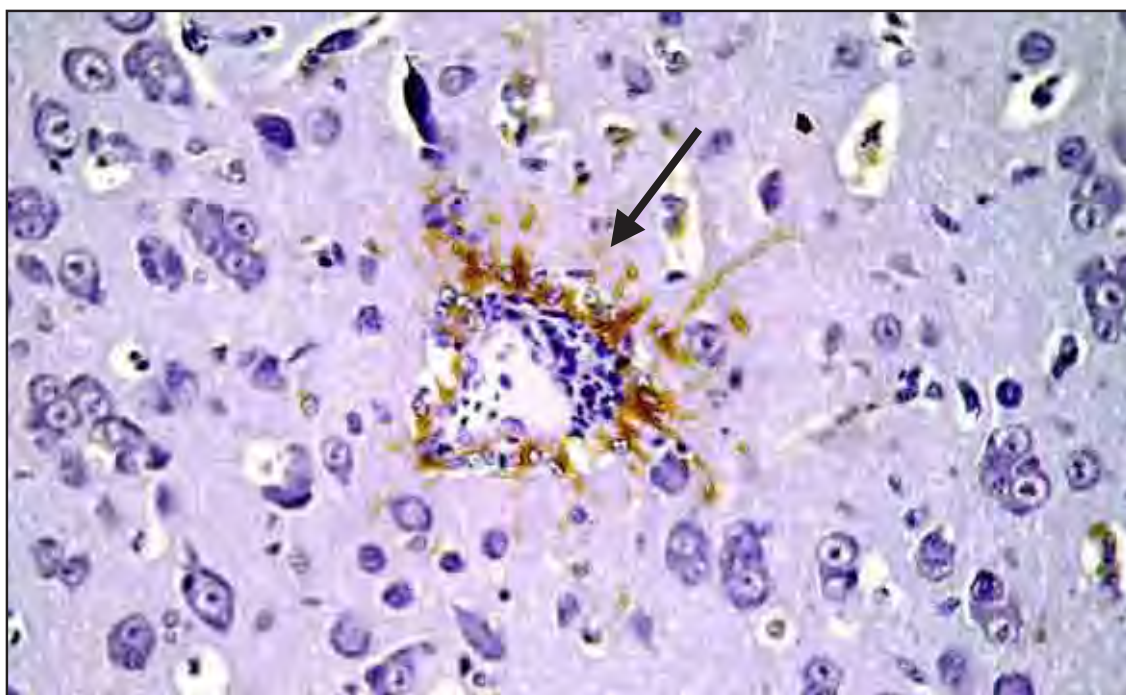


Figura 18: Fotomicrografia de córtex cerebral demonstrando os astrócitos na região perivascular (seta). Anti-GFAP. 40X. Ave normal.

5.5 Avaliação dos casos naturais de Encefalomalácia Nutricional

5.5.1 Aspectos clínicos-epidemiológicos

Na Tabela 09 estão descritos alguns aspectos clínicos-epidemiológicos dos casos naturais de Encefalomalácia Nutricional utilizados para a avaliação do comportamento dos astrócitos na patogenia.

Nota-se que os principais sintomas clínicos observados foram paralisia, incoordenação, torcicolo, tremores e movimentos de pedlagem.

A faixa etária onde foram observados os sinais clínicos e as mortes varia desde a primeira até a quinta semana de idade.

5.5.2 Alterações histopatológicas

As principais alterações histopatológicas observadas nos casos naturais de Encefalomalácia reavaliados foram vacuolização e malácia na substância branca do cerebelo (Foto 19), vacuolização citoplasmática e degeneração de células de Purkinje e malácia focalmente extensa na substância cinzenta cortical (Foto 20). Nas áreas de necrose visibilizou-se a presença de trombos hialinos em capilares sanguíneos, hemorragia e neurônios isquêmicos. Ademais, foi notada inflamação mononuclear submeníngica em casos com sintomatologia aguda.

Em um caso foi constatada a presença de malácia na camada granulosa da substância cinzenta cerebelar.

Gliose foi observada em todas as regiões que apresentavam alguma lesão supracitada.

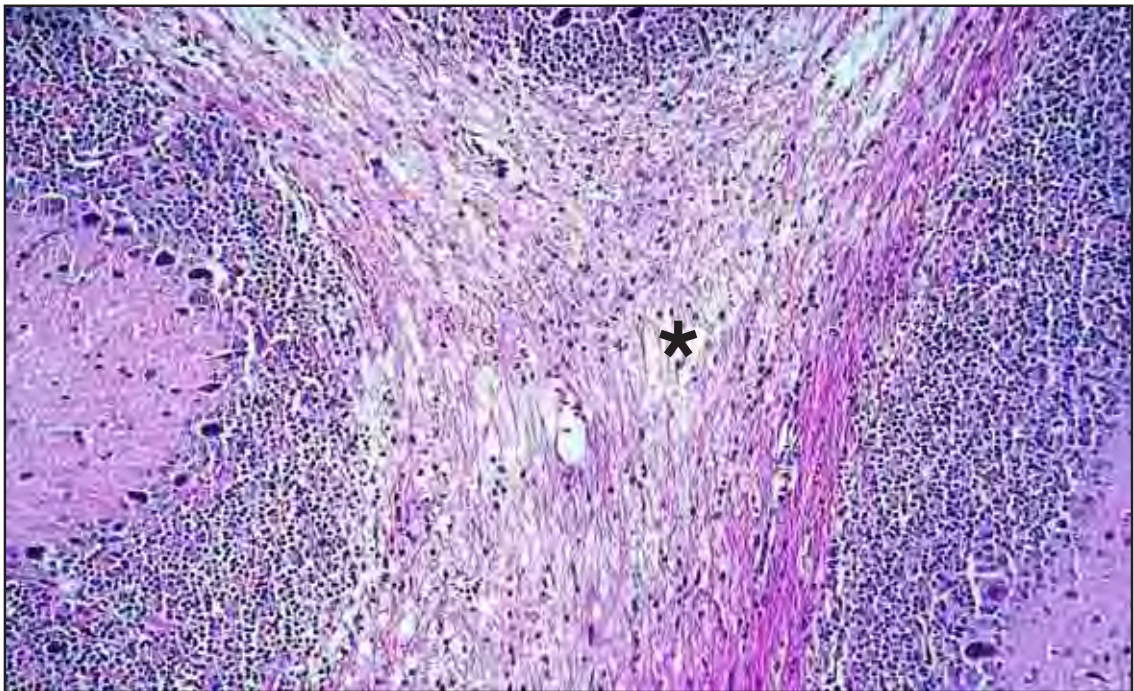


Figura 19: Fotomicrografia de cerebello apresentando malácia na substância branca (*). HE. Obj. 10X. Ave com EN.

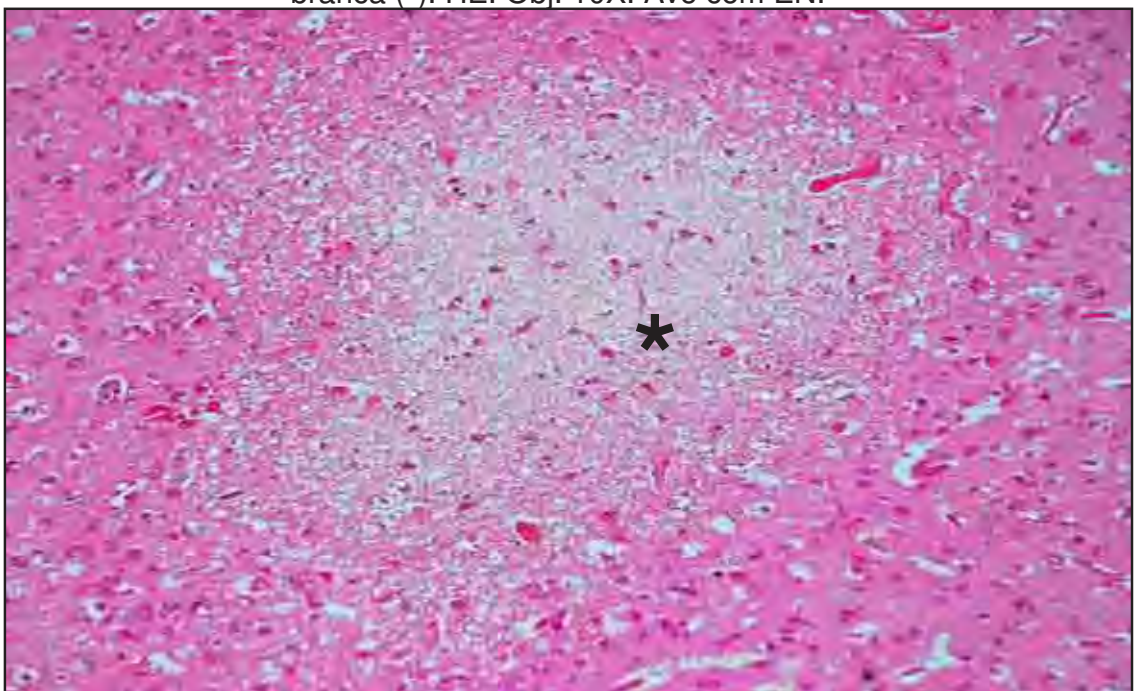


Figura 20: Fotomicrografia de córtex cerebral apresentando malácia (*) com

presença de trombose em capilares. HE. Obj. 10X. Ave com EN.

5.5.3 Avaliação do comportamento dos astrócitos na patogenia da Encefalomalácia Nutricional

Pelo exame imunohistoquímico, utilizando-se um anticorpo primário anti-GFAP, foi possível realizar a avaliação do comportamento de astrócitos perante a patogenia da EN.

Observou-se astrogliose e astrocitose acentuada em áreas adjacentes a malácia, ou seja, na substância branca do cerebelo (Foto 21) e na substância cinzenta do córtex cerebral (Foto 22 e 23).

Em áreas onde foi observada meningite, constatou-se a presença de astrogliose e astrocitose na região contígua a inflamação (Foto 24), assim como na camada granular e das células de Purkinje do cerebelo, onde havia vacuolização e degeneração de tais células.

Ao redor de artérias e arteríolas, das áreas adjacentes as lesões, constatou-se a presença de astrogliose e astrocitose acentuada (Foto 25).

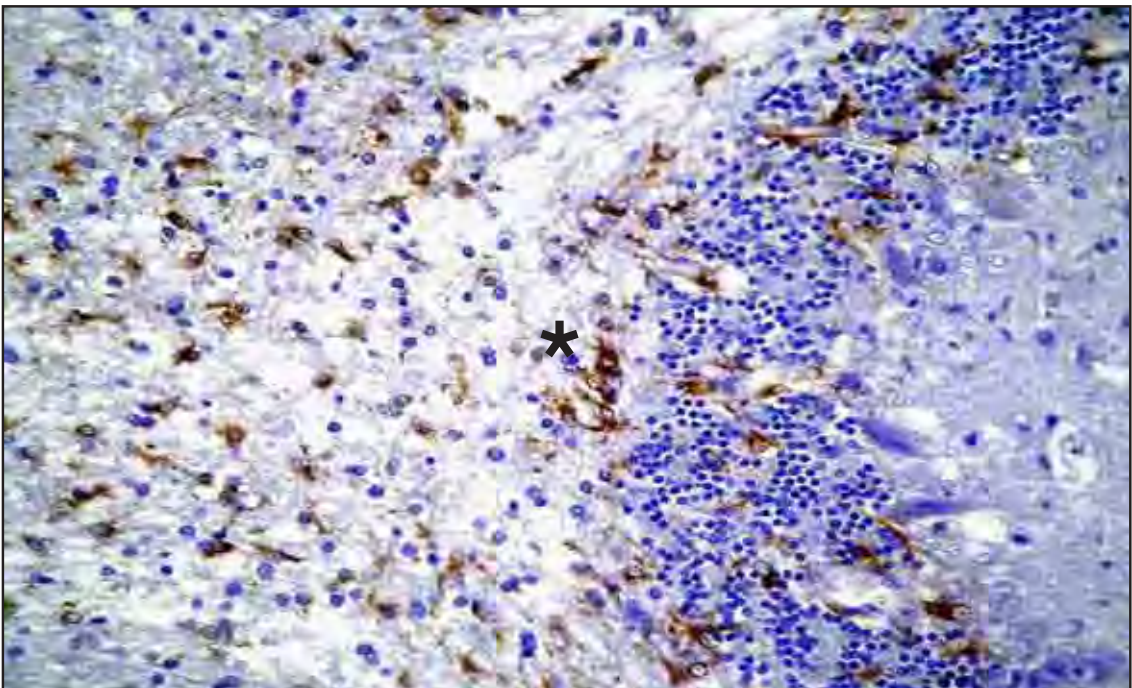


Figura 21: Fotomicrografia de cerebelo apresentando astrogliose e astrocitose adjacente à área de vacuolização na substância branca (*). Anti-GFAP. Obj. 4X. Ave com EN.

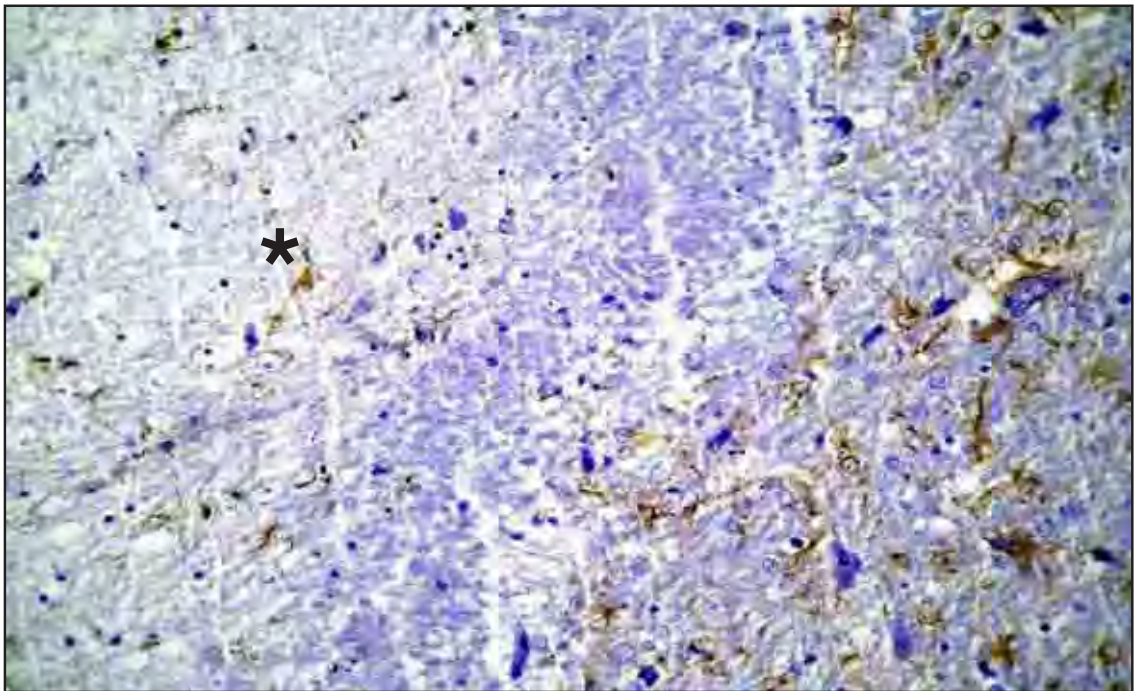


Figura 22: Fotomicrografia de córtex cerebral apresentando astrogliose e astrocitose adjacente à área de vacuolização na substância branca (*). Anti-GFAP. Obj. 40X. Ave com EN.

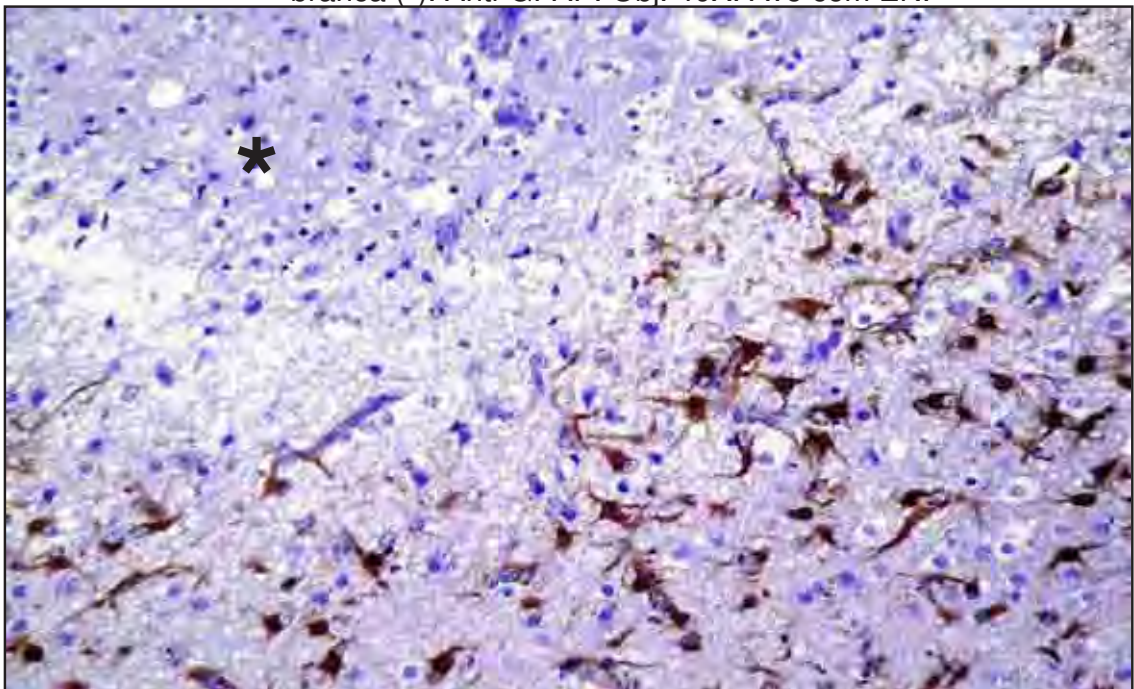


Figura 23: Fotomicrografia de cérebro demonstrando astrogliose e astrocitose adjacente à área de malácia (*). Anti-GFAP. Obj. 40X. Ave com EN.

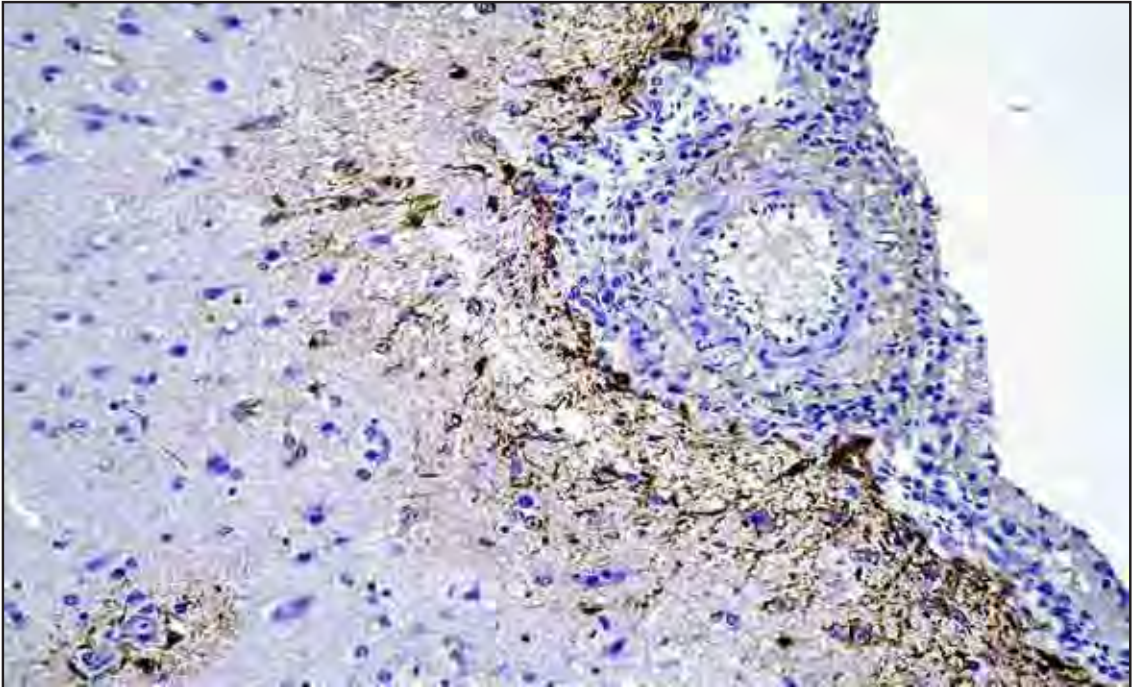


Figura 24: Fotomicrografia de colículo demonstrando astrogliose e astrocitose adjacente à meningite mononuclear. Anti-GFAP. Obj. 4X. Ave com EN.

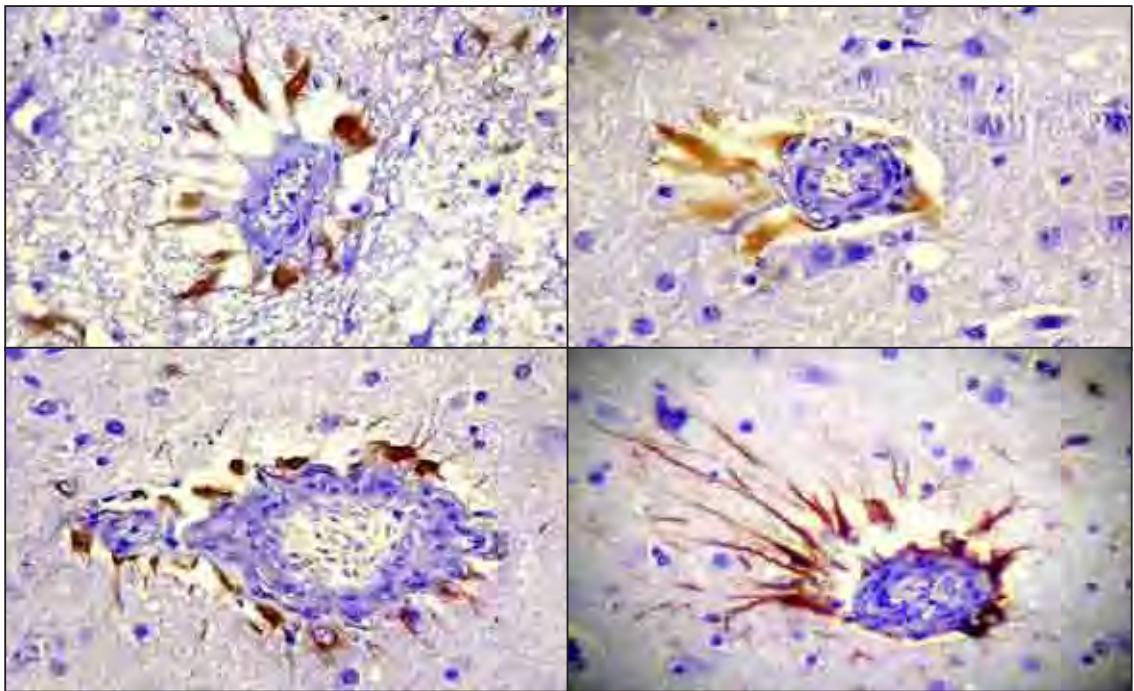


Figura 25: Fotomicrografias de córtex cerebral demonstrando astrogliose e astrocitose perivascular acentuada. Anti-GFAP. Obj. 20X. Ave com EN.

VI DISCUSSÃO

Os estudos referentes a assuntos ligados a Neuropatologia tiveram grande evolução nesses últimos vinte anos. Esta muito se deve aos trabalhos publicados sobre neuropatias que acometem os animais domésticos e selvagens, tanto em casos naturais, como modelos experimentais, que de certa forma, auxiliam o entendimento da etiopatogenia de doenças neurológicas que acometem os seres humanos.

Algumas enfermidades nervosas importantes, que acometem o homem, não têm suas causas e patogenias totalmente elucidadas. Como exemplos têm-se doenças desmielinizantes como a Esclerose Múltipla, e doenças degenerativas como a Doença de Alzheimer e a Doença de Parkinson, encefalopatias humanas que causam milhares de mortes ao ano no mundo.

Como a pesquisa dessas doenças torna-se restrita por se tratarem de vidas humanas, a principal alternativa para seu estudo é a utilização de modelos

experimentais com animais, a fim de se entender a evolução de determinadas doenças que apresentam lesões semelhantes às aquelas encontradas nas encefalopatias que acometem o homem.

Como exemplo tem-se a Cinomose, uma doença que causa desmielinização em canídeos, principalmente. Muitos trabalhos descrevem a participação de células nervosas na patogenia desta doença, que serve de modelo comparativo à Esclerose Múltipla, que também gera desmielinização em humanos.

Normalmente pesquisam-se encefalopatias em mamíferos como modelo experimental comparativo a doenças neurológicas humanas. Fato observado em estudos onde foram utilizados bovinos, eqüinos, suínos, caninos, felinos e roedores.

Não há pesquisas utilizando-se encefalopatias que acometem aves para comparar suas patogenias com doenças análogas as do homem.

Portanto, neste trabalho utilizou-se a Encefalomalácia Nutricional em aves, a principal neuropatia aviária, como modelo para o estudo do comportamento dos astrócitos nas doenças que geram malácia no encéfalo de outros animais e no ser humano.

6.1 Indução da Encefalomalácia Nutricional utilizando-se uma ração deficiente em vitamina E

A vitamina E tem uma função antioxidante no organismo, pois captura radicais peroxila e alcoxila, impedindo que se forme uma reação de lipoperoxidação em membranas celulares. Uma unidade internacional (UI) de vitamina E corresponde a atividade biológica de 01 mg do acetato de α -tocoferol, o principal antioxidante lipossolúvel que atua nas membranas celulares.

Segundo Jordão-Jr et al. (1998), os animais são incapazes de sintetizar o α -tocoferol, sendo dependentes das fontes dietéticas para a incorporação deste composto no organismo. Portanto, uma dieta deficiente em vitamina E pode gerar oxidação de membranas celulares.

Muitas doenças em seres humanos apresentam oxidação em membranas celulares. Vannucchi et al. (1998) relatam que a Diabetes Mellito, a Artrite Reumatóide e a Osteoartrite cursam com peroxidação lipídica, fato que comprova a importância do equilíbrio dos níveis de vitamina E na dieta.

A Encefalomalácia Nutricional é uma doença que acomete aves jovens, com uma a cinco semanas de idade, que tem atribuída como etiologia a deficiência de vitamina E.

Klein et al. (1994) citam que a deficiência de vitamina E associada à administração de fonte de gordura oxidada na ração leva a EN em perus jovens, naturalmente.

Estes dados corroboram os estudos de Bartov e Bornstein (1971) e de Dror e Bartov (1980) que adotaram, no modelo experimental de EN, rações apresentando fontes de gordura oxidadas por aeração térmica e deficientes em vitamina E.

Dror e Bartov (1980) afirmam que para a indução da EN em *Gallus gallus domesticus* é necessária a administração de ração contendo deficiência em vitamina E e presença de ácidos graxos poliinsaturados. Porém, outros fatores podem exacerbar os sintomas neurológicos da EN. Entre eles destacam-se a quantidade de vitamina E transmitida maternamente, a quantidade de ácidos graxos insaturados nos ovos, a presença de antioxidantes sintéticos e coccidiostáticos, a fonte de gordura e seu grau de oxidação lipídica e a quantidade de vitaminas A e C na ração.

Portanto, a fim de se induzir a Encefalomalácia Nutricional em *Gallus gallus domesticus*, foi realizado nesta pesquisa três experimentos diferentes utilizando-se rações deficientes em vitamina E, contendo ou não fontes de gordura oxidadas por aeração térmica.

No E1 foi administrada aos animais uma ração contendo sorgo como fonte de carboidratos e ausência de fonte de gordura. Ao suplemento vitamínico-mineral não foi incorporada vitamina E. A justificativa para a utilização de sorgo na dieta, ao invés de milho, foi baseada na quantidade de α -tocoferol presente nestas fontes.

Conforme o National Research Council (NRC) para aves de 1994, o milho apresenta 55 mg/kg de α -tocoferol em sua composição, já o sorgo apresenta 07 mg/kg de α -tocoferol. Logo o sorgo foi escolhido como fonte energética por apresentar menor teor de vitamina E.

No E2 foi administrada às aves uma ração apresentando amido de milho como fonte de carboidrato e óleo de peixe não-oxidado como fonte de gordura. Ao Grupo A foi fornecida uma ração com ausência de vitamina E no suplemento vitamínico-mineral.

Bartov e Bornstein (1972) compararam em seus estudos duas rações com fontes de carboidratos diferentes, uma com amido de milho e outra com amido de batata. O grupo experimental que se alimentou com ração a base de amido de batata apresentou maior número de casos de EN em relação ao grupo de animais, os quais foram fornecidos ração com amido de milho. Animais que se alimentaram com ração a base de amido de milho e com presença de vitamina E não apresentaram sinais neurológicos da EN.

Essa diferença na ocorrência da EN, conforme a fonte de carboidrato consumida, sugere uma razão pela qual os animais do E2 não apresentaram a doença, já que estes foram alimentados com ração contendo amido de milho.

No E3 foi realizada a tentativa de indução da EN baseada nos trabalhos de Bartov e Bornstein (1972) e Dror e Bartov (1980), nos quais foram utilizadas nas rações diferentes fontes de gordura, oxidadas ou não, de origem animal e vegetal. Nestas pesquisas verificou-se que o óleo de cártamo oxidado é a melhor fonte de gordura para ser adicionada na ração a fim de se induzir a Encefalomalácia Nutricional.

Bartov e Bornstein (1972) aqueceram os óleos por 48 horas a uma temperatura entre variante entre 155 – 170 ° C. Dror e Bartov (1980) oxidaram o óleo de cártamo numa temperatura menor, porém constante de 145°C. Entretanto, deixaram o óleo aquecendo por 72 horas.

No presente trabalho foi utilizado como fonte de gordura vegetal, óleos de soja e girassol e como fonte de gordura animal óleo de vísceras de frango, óleo de

peixe e gordura saturada bovina. Os óleos insaturados sofreram aeração térmica por oito horas, a uma temperatura de 250°C.

Além disso, não foi incorporado ao suplemento vitamínico-mineral antioxidantes sintéticos e coccidiostáticos, assim como sugerido nos estudos de Bartov e Bornstein (1972) e Dror e Bartov (1980).

A ausência de sintomas neurológicos nos animais de todos os grupos experimentais do E3 pode estar relacionada com a técnica de aeração térmica utilizada para oxidar os óleos, pois neste estudo o aquecimento foi realizado com uma temperatura maior, porém, por um tempo mais curto.

Os animais do G09 do E3 apresentaram sintomas clínicos e lesões anatomopatológicas compatíveis com as observadas na Diátese Exsudativa, pois foi observado edema no tecido subcutâneo, afastamento dos membros quando os animais deitam-se e hemorragias na musculatura do peito e das pernas, como descrito por Austic e Scott (1991).

Notou-se que os frangos do G09 se alimentavam menos que os animais dos demais grupos experimentais.

A ração contendo gordura saturada bovina apresentou cheiro acre e desagradável. Estas características certamente contribuíram para a diminuição do consumo desta ração, justificando assim a deficiência de selênio e o aparecimento da Diátese Exsudativa em nove frangos.

Os óleos de peixe, soja e girassol oxidados apresentaram resultado positivo na reação de Kreiss, que avalia a rancificação da fonte de gordura. O óleo de frango apresentou resultado negativo na reação de Kreiss, porém todos os óleos supracitados, inclusive o de frango, apresentaram níveis de peróxidos acima dos desejados na indústria no teste de índice de peróxidos.

Todas as rações utilizadas no E3 sofreram análise para a quantificação de vitamina E. Pela cromatografia líquida de alta eficiência notou-se que algumas rações apresentaram quantidade insignificante de vitamina E, abaixo do limite de quantificação do método. Ademais, em outras rações nem sequer foi detectada a presença de vitamina E.

Com base nas análises realizadas nos óleos e na ração, supõe-se que para a indução da Encefalomalácia Nutricional não é necessária somente a utilização de uma ração deficiente em vitamina E e composta com óleos oxidados. Talvez outros fatores já descritos, como a quantidade de vitamina E transmitida verticalmente, a quantidade e tipos de ácidos graxos presentes nos ovos e a presença de vitamina A e C na ração sejam tão importantes quanto a própria deficiência de vitamina E na dieta.

6.2 Casos naturais de Encefalomalácia Nutricional – Características clínicas-epidemiológicas e lesões anatomopatológicas

A EN é uma doença neurológica, com características próprias, que acomete aves jovens em todo o mundo, e que gera grandes prejuízos a indústria devido à perda no rendimento de crescimento do frango, aos gastos com medicamentos e a alta mortalidade.

Neste trabalho foram avaliados 12 surtos de EN, ocorridos entre 1996 e 2005, diagnosticados no Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP e no Laboratório de Patologia Animal do CAV-UDESC. Tais surtos ocorreram naturalmente, principalmente, provenientes de criações industriais.

Em apenas dois surtos não é conhecida origem geográfica. Dos outros 10 surtos, notou-se que quatro regiões brasileiras apresentaram casos naturais de EN, sendo que somente na região Norte não foram diagnosticados casos, o que não significa a ausência desta doença nesta localidade.

Os casos são provenientes de cidades com diferentes tipos de clima. A EN ocorreu em locais apresentando clima árido como em Caruaru-PE, passando pelo clima seco de Brasília-DF, e finalmente por Lages-SC, onde as temperaturas são baixas o ano todo. Esses dados indicam que a EN é uma doença não influenciada pelas condições climáticas, justificando a distribuição cosmopolita desta encefalopatia.

Em relação às linhagens acometidas, constatou-se que a maioria dos casos ocorreu em frangos de corte, corroborando os dados apresentados por Cheville (1994); Austic e Scott (1997); Jones et al. (2000) e de Faria e Junqueira (2000).

Assim como observado por Page et al. (1980), um surto ocorreu em frangos apresentando linhagem de postura, porém, Page et al. (1980) relataram a presença de EN em aves com 35 semanas de idade, e nesta pesquisa observou-se em aves com 21 dias de idade.

Quanto à faixa etária dos frangos que apresentaram EN, neste presente trabalho notou-se que os animais acometidos apresentavam de uma a cinco semanas de idade, resultado observado por diversos autores (DROR e BARTOV, 1980; RANDALL et al., 1993; CHEVILLE, 1994; GOODWIN et al., 1996; AUSTIC e SCOTT, 1997; CHAMANZA et al., 1998; JONES et al., 2000; de FARIA e JUNQUEIRA, 2000). A Encefalomalácia Nutricional é clinicamente caracterizada por diversos sinais neurológicos, tais como ataxia, andar em círculos, retração da cabeça para baixo, para cima ou lateralmente, rápida contração e relaxamento de pernas, paralisia, prostração e morte (HASHOLT e PETRAK, 1982; JORTNER et al., 1985; KLEIN et al., 1994; de FARIA e JUNQUEIRA, 2000; JONES et al., 2000).

Nos surtos avaliados, segundo o histórico clínico fornecido, os frangos apresentaram torcicolo, paralisia, incoordenação, movimentos de pedagem, opistótono, tremores, ataxia, inapetência e morte, sintomas clínicos típicos da EN, corroborando as observações dos autores supracitados.

O diagnóstico da Encefalomalácia Nutricional é altamente confiável tendo como base o histórico clínico-epidemiológico, principalmente em relação às informações referentes à faixa etária dos animais acometidos e os sintomas clínicos observados.

Entretanto, o diagnóstico diferencial sempre deve ser realizado a fim de se descartar outras encefalopatias como a Encefalomielite Aviária, causada por vírus, caracterizada por uma encefalomielite difusa não-supurativa com presença de manguitos linfocitários perivasculares no SNC, microgliose nos núcleos rotundus e

ovoidalis do mesencéfalo e cromatólise de neurônios dos núcleos da base, na medula oblonga, lesões patognômicas desta doença (CALNEK et al., 1997).

A fim de se confirmar o diagnóstico da EN, o exame anatomopatológico deve sempre ser realizado. Na macroscopia observa-se principalmente malácia e petéquias no cerebelo, lesões típicas da doença. Entretanto, o exame histopatológico é quem confirma o diagnóstico de Encefalomalácia Nutricional.

Outros métodos auxiliares de diagnóstico podem ser realizados tais como, exame imunoistoquímico para a visualização do comportamento dos astrócitos nas áreas lesionadas, análise quantitativa e qualitativa de peróxidos na ração e detecção da quantidade de vitamina E na dieta pela CLAE.

Na reavaliação histopatológica dos casos naturais de EN descritos nesta pesquisa, notou-se principalmente a presença de hemorragia e malácia na substância branca cerebelar, e malácia na substância cinzenta do córtex cerebral com presença de trombos hialinos em capilares da área necrosada.

Essas lesões histopatológicas foram observadas por diversos autores (BAINS, 1979; KLEIN et al., 1994; RANDALL et al., 1996; AUSTIC e SCOTT, 1997; VIOTT et al., 2003), confirmando que são as principais alterações microscópicas observadas no SNC em aves com Encefalomalácia Nutricional.

6.3 Protocolo imunoistoquímico para a detecção de astrócitos no SNC de *Gallus gallus domesticus*

O protocolo imunoistoquímico empregado na imunomarcagem de astrócitos foi adaptado segundo os trabalhos de Jardim et al. (2001), Jardim (2003) e Pedraza Ordóñez (2003), os quais detectaram a presença destas células no SNC de caninos, camundongos e bovinos respectivamente.

Nesta pesquisa foi utilizado um anticorpo primário anti-GFAP bovino produzido em coelho diluído a 1:500 em PBS. Segundo a empresa que produz o anticorpo, esse é capaz de produzir uma reação cruzada com astrócitos de frangos.

A recuperação antigênica foi realizada com uma solução de Pronase a 5% em PBS. Esse método foi utilizado por Jardim (2003) e Ordóñez (2003), sendo que em suas pesquisas foram obtidos resultados semelhantes, pois os astrócitos apresentaram intensa imunomarcagem.

O bloqueio de proteínas contra reações inespecíficas foi realizado com uma solução de leite em pó Molico® a 3% em PBS, corroborando o método utilizado por Jardim et al. (2001) e Jardim (2003). Comparada com a solução de albumina sérica bovina a 2,5% em PBS utilizada nos estudos de Pedraza Ordóñez (2003), não houve diferença no bloqueio da reação.

A diluição do anticorpo primário diferiu de vários estudos. Machado e Alessi (1997) e Lemos e Alessi (1999) e Pedraza Ordóñez (2003) diluíram o anticorpo em 1:300 para observar astrócitos no SNC de bovinos e eqüinos.

Jardim et al. (1999) e Jardim (2003) utilizaram uma diluição de 1:500 em PBS, assim como o presente trabalho.

Esta variação na diluição pode estar relacionada com a sensibilidade dos astrócitos das diferentes espécies utilizadas diante ao anticorpo anti-GFAP bovino.

Em relação ao tempo e temperatura de incubação do anticorpo primário, notou-se que Machado e Alessi (1997), Lemos e Alessi (1999), Jardim et al. (2001), Jardim (2003) e Pedraza Ordóñez (2003) empregaram técnicas semelhantes, incubando-o por longo período, variando entre 14-20 horas, em baixa temperatura (4°C). Diferindo dos autores supracitados, nesta pesquisa o anticorpo primário foi incubado por período curto (3-4 h) em temperatura ambiente, entretanto os resultados foram similares, pois os astrócitos foram normalmente detectados.

Quanto à incubação do anticorpo secundário, neste estudo utilizou-se um conjugado biotinilado produzido em cabra anti-Imunoglobulina G de coelho, diluído em 1:300 em PBS, mantido em temperatura ambiente.

Relacionando com demais pesquisas (MACHADO E ALESSI, 1997; LEMOS E ALESSI, 1999; JARDIM et al., 2001), notou-se que tal diluição é menos custosa,

por conseguinte, mais vantajosa, pois é utilizada menor quantidade de anticorpo secundário.

Em *Gallus gallus domesticus* hípidos não foi observada diferença na marcação dos astrócitos das diferentes regiões do encéfalo e mesmo entre os indivíduos.

O citoplasma astrocitário corou-se fortemente em marrom escuro e o núcleo que foi contra corado com hematoxilina de Harris, apresentou uma coloração roxa escura.

Nas aves apresentando Encefalomalácia Nutricional houve uma variação quanto à intensidade da reação astrocitária. Algumas aves apresentaram forte reação, enquanto em outras, observou-se leve marcação dos astrócitos ou, às vezes, reação negativa frente ao anticorpo.

Provavelmente essa variação deve-se ao tempo de conservação dos fragmentos de SNC no formaldeído. Nos casos diagnosticados até 2002, não se sabe qual é o tempo em que estes fragmentos ficaram sob ação da solução fixadora.

Os casos EN que ocorreram entre 2003 e 2005 foram fixados em solução de formol a 10% por 24 horas.

Os astrócitos das aves acometidas neste período apresentaram forte marcação, portanto, sugere-se que o tempo de fixação influencie na reação imunistoquímica, diferentemente das reações observadas por Lemos e Alessi (1999), onde esses descrevem que no SNC de eqüinos ocorre forte imunomarcação de astrócitos, mesmo em fragmentos conservados por longos períodos em solução de formaldeído e mantidos em blocos de parafina.

6.4 Avaliação do comportamento dos astrócitos na patogenia da Encefalomalácia Nutricional em *Gallus gallus domesticus*

Não há publicado dados sobre o comportamento dos astrócitos na patogenia da Encefalomalácia Nutricional, logo, o presente estudo é um importante passo

para o entendimento da ação destas células na mais freqüente neuropatia que acomete as aves domésticas.

Observou-se que os astrócitos localizados nas lesões, ou na periferia destas, sofrem astrogliose e astrocitose, com variação no tamanho do núcleo e, às vezes, com ausência de prolongamentos citoplasmáticos. Tal fato foi observado por Jardim et al. (2001), em cães apresentando Meningoencefalite Granulomatosa e por Machado e Alessi (1997) em bovinos apresentando Raiva.

A hipertrofia do núcleo e a ausência de prolongamentos citoplasmáticos sugerem que os astrócitos aumentam a síntese nuclear e, ao mesmo tempo, sofrem degeneração por estarem localizados na área lesada.

Em um caso constatou-se a presença de astrócitos gemistocíticos adjacentes a uma área de malácia no córtex cerebral. No mesmo fragmento, porém um pouco mais distante da área lesionada, notou-se a presença de astrocitose na região perivascular (espaço de Virchow-Robbin), porém, sem haver lesão endotelial histologicamente. Esta observação sugere que os astrócitos reagem pela hipertrofia celular nestas áreas, provavelmente tentando reforçar a atividade da barreira hemato-encefálica, por conseguinte, protegendo os vasos sangüíneos de radicais livres e peróxidos.

No córtex cerebral de *Gallus gallus domesticus* hígidos observou-se a presença de astrócitos na glia limitante externa (região subpial), na glia limitante interna (região subependimária) e ao redor de vasos sangüíneos. Portanto, sugere-se que os astrócitos, em animais acometidos pela EN, migram para as adjacências da área necrosada, indicando que tais células participam na patogenia, provavelmente isolando a lesão, a fim de se impedir a disseminação desta, promovendo uma cicatrização glial.

Na região do lobo óptico foi observada desmielinização leve e focal, próxima a glia limitante externa, com presença de infiltrado inflamatório mononuclear na meninge. Associada a estas alterações, constatou-se a presença de astrogliose e astrocitose, indicando que não só a desmielinização, mas também a inflamação atraem os astrócitos para a região afetada.

Estes dados corroboram o trabalho de Jardim et al. (2001) que observaram astrocitose e astrogliose em áreas desmielinizadas no SNC de cães com Cinomose, e os estudos de Machado e Alessi (1997) e Pedraza Ordóñez (2003) onde foi visibilizada a presença de astrócitos reativos em regiões apresentando processo inflamatório.

Em aves híbridas, como observado por Shin et al. (2002), os astrócitos estão distribuídos de uma forma generalizada no trato óptico, principalmente no *stratum opticum*, no *stratum album centrale*, no *stratum griseum periventriculare* e no *stratum fibrosum periventriculare*, sendo que os prolongamentos citoplasmáticos estendem-se à camada cinzenta e a glia limitante externa. Como observado no córtex cerebral, neste estudo, os astrócitos também envolvem os vasos sanguíneos localizados no lobo óptico.

A grande quantidade de astrócitos presentes no lobo óptico indica que estas células apresentam papel importante na fisiologia e nos processos patológicos, já que esta região apresenta o maior número de sinapses de axônios retinianos (SHIN et al., 2002).

No cerebelo dos animais com EN notou-se desmielinização e malácia na substância branca com presença de acentuada astrocitose e astrogliose. Na camada granular e das células de Purkinje visibilizou-se leve astrogliose e astrocitose.

Como observado por Machado e Alessi (1997), na região das células de Purkinje e da camada granular cerebelar ocorre reação astrocitária frente à lesão viral gerada nos neurônios destas regiões. No presente estudo sugere-se que ocorreu esta reação como resposta às lesões observadas nas células de Purkinje.

A principal região do SNC afetada nos casos de Encefalomalácia Nutricional é a substância branca cerebelar, haja vista a presença de extensas áreas de desmielinização, malácia e hemorragia no exame histopatológico dos casos naturais reavaliados.

A substância branca cerebelar de *Gallus gallus domesticus* sadios apresenta acentuada quantidade de astrócitos, portanto, é esperada grande reação astrocitária, com presença de astrogliose e astrocitose nesta região.

6.5 Considerações finais

O presente trabalho surge como o primeiro realizado no Brasil buscando a indução da Encefalomalácia Nutricional em *Gallus gallus domesticus*, e o primeiro no mundo a pesquisar o comportamento dos astrócitos na patogenia desta neuropatia.

Mesmo que os resultados não tenham sido os esperados, relacionados com a indução da doença, abriram-se novas portas para discussões sobre a etiologia da Encefalomalácia Nutricional, já que se provou que a simples deficiência de vitamina E não causa a doença.

Constatou-se que os astrócitos cumprem papel importante na patogenia da EN, e que a comparação da imunomarcagem destas células em aves sadias ou apresentando encefalopatias pode auxiliar no diagnóstico das doenças que acometem o SNC de *Gallus gallus domesticus*.

Finalmente, em contribuição ao Médico Veterinário Patologista, no presente trabalho, propôs-se, como padronização para o diagnóstico de encefalopatias aviárias pelo exame histopatológico e imunoistoquímico, cortes transversais do córtex cerebral, do lobo óptico e do cerebelo, bem como cortes longitudinais do encéfalo.

VII CONCLUSÕES

- As dietas utilizadas nos experimentos E1, E2 e E3 não foram capazes de induzir experimentalmente a Encefalomalácia Nutricional em *Gallus gallus domesticus*.

- A Encefalomalácia Nutricional em *Gallus gallus domesticus* não é causada somente pela deficiência de vitamina E.

- O protocolo imunoistoquímico utilizando-se o anticorpo anti-GFAP bovino produzido em coelho é eficaz na marcação de astrócitos no SNC de *Gallus gallus domesticus*.

- A caracterização da distribuição de astrócitos no SNC de *Gallus gallus domesticus* hígidos contribui para o diagnóstico de encefalopatias aviárias onde os astrócitos tenham participação na patogênese.

- Os astrócitos participam na patogenia da Encefalomalácia Nutricional em *Gallus gallus domesticus* uma vez que respondem com astrocitose e astrogliose em áreas desmielinizadas, necrosadas e particularmente na região perivascular.

VIII REFERÊNCIAS

ABBOTT, N.J. Glial-neuronal interactions. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.633, p.1-18, 1991.

ALESSI, A.C. **Estudo experimental sobre a patogenia da encefalomielite murina de Theiler.** 1991. 65f.Tese (Livre-Docência)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1991.

AUSTIC, R.E.; SCOTT, M.L. Nutritional diseases. In: CALNEK, B.W. et al. **Diseases of poultry.** 10. ed. Ames: Iowa State University Press, 1997. p. 47-80.

BAINS, B.S. **A Manual of poultry diseases.** Basle: Roche, 1979. 297 p.

BARTOV, I.; BORNSTEIN, S. Nutricional factors affecting the occurrence of experimental encephalomalacia in chicks. **Poult. Sci.**, v.51, n.3, p. 868-876, 1972.

BIGNAMI, A.; DAHL, D. Astrocyte-specific protein and neuroglial differentiation. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic protein. **J. Comp. Neurol.**, v.153, p.27-38, 1974.

BOYES et al. Immunohistochemical co-localization of S-100 and the glial fibrillary acidic protein in rat brain. **Neuroscience**, v.17, n.3, p.857-865, 1986.

CALNEK, B.W.; LUGINBUHL, R.E.; HELMBOLDT, C.F. Avian Encephalomyelitis. In: CALNEK, B.W. et al. **Diseases of poultry**. 10. ed. Ames: Iowa State University Press, 1997. p. 571-582..

CAMERON-CURRY, P. et al. Immunocytochemical distribution of glial fibrillary acidic protein in the central nervous system of the japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Anat. Embryol.**, v.184, p.571-581, 1991.

CHAMANZA, R. et al. Enterococcus-associated encephalomalacia in one-week-old chicks. **Vet. Rec.** v.143, p. 450-451, 1998.

CHEVILLE, N.F. Doenças Nutricionais. In:_____.**Introdução à patologia veterinária**. São Paulo: Manole, 1994. p. 521-533.

De FARIA, D.E.; JUNQUEIRA, O.M. Enfermidades Nutricionais. In: BERCHIERI JR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, 2000. p. 431-448.

DONG, Y.; BENVENISTE, E.N. Immune function of astrocytes. **Glia**, v.36, p.180-190, 2001.

DORF, M.A. et al. Astrocytes express functional chemokine receptors. **J. Neuroimmunol.**, v.111, p.109-121, 2000.

DROR, Y; BARTOV, I. Dietary factors affecting experimental models of nutritional encephalomalacia. **Poult. Sci.**, v.61, p.84-93, 1980.

ENG, L.F. et al. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. **Brain Res.**, v.28, p.351-354, 1971.

FUHRMANN, H; SALLMANN, H.P. Brain, liver and plasma unsaturated aldehydes in nutritional encephalomalacia of chicks. **J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.**, v.47, n.3, p.149-155, 2000.

FUHRMANN, H. et al. Tissue lipid peroxidation in nutritional encephalomalacia of broiler chickens. **Zentralbl. Veterinarmed. A.**, v.43, n.1, p.09-21, 1996.

FUHRMANN, H.; SALLMAN, H.P. The influence of dietary fatty acids and vitamin E on plasma prostanoids and liver microsomal alkane production in broiler chickens with regard nutritional encephalomalacia. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v.41, n.5, p.553-561, 1995.

GOODWIN, M.A.; BROWN, J.; WALTMAN W.D. Neonatal multifocal encephalomalacia and other lesions in the brains of Georgia chicks: 1991-95. **Avian Dis.**, v.40, n.4, p.894-899, 1996.

HAJÓS, F.; KÁLMÁM, M. Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP) – immunoreactive astrocytes in the rat brain. **Exp. Brain. Res.**, v.78, p.164-173, 1989.

HAKKAHAINEN, J. et al. Vitamin E deficient fat component for composing experimental diets. **Acta. Vet. Scand.**, v.24, n.1, p.129-132, 1983.

HASHOLT J.; PETRAK, M.L. Diseases of the Nervous System. In: PETRAK, M.L. **Diseases of cage and aviary birds**. 2.ed. Filadélfia: Lea & Fabiger, 1982. p.468-477.

JARDIM, L.S.; ANDRADE-NETO, J.P.; ALESSI, A.C. Astrocytic reaction in the canine granulomatous meningoencephalomyelitis. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, vol.53, n.2, p.1-4, 2001.

JARDIM, L.S. **Quimiocinas MIP-1Alfa, MIP-1 Beta e Rantes na encefalite experimental induzida pelo vírus da estomatite vesicular em camundongos**. 2003. 61p. Tese (Doutorado em Patologia Animal)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. Deficiências nutricionais. In:_____.**Patologia veterinária**. 6.ed. São Paulo: Manole, 2000. p. 715-829.

JORDÃO-JR, A.A.; CHIARELO, P.G.; BERNARDES, M.S.M.; VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathiona reduzida e da vitamina E. **Medicina Ribeirão Preto**, v.31, p.434-449, 1998.

JORTNER, B.S. et al. Encephalomalacia associated with hypovitaminosis E in turkeys. **Avian. Dis.**, v.29, n.2, p. 488-498, 1985.

KALMAN, M.; SZEKELY, A.D.; CSILLAG, A. Distribution of glial fibrillary acidic protein-immunopositive structures in the brain of the domestic chicken (*Gallus domesticus*) **J. Comp. Neurol.**, v.330, n.2, p.221-237, 1993.

KALMAN, M.; SZEKELY, A.D.; CSILLAG, A. Distribution of glial fibrillary acidic protein and vimentin-immunopositive elements in the developing chicken brain from hatch to adulthood. **Anat. and Embr.**, v.198, n.3, p.213-235, 1998.

KLEIN, D.R.; NOVILLA, M.N.; WATKINS, K.L. Nutritional encephalomalacia in turkeys: diagnosis and growth performance. **Avian Dis.**, v.38, n.3, p.653-659, 1994.

KUMAR, V.; COTRAN, R.S.; ROBBINS, S.L. **Patologia Básica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 608p.

LEMOS, K.R.; ALESSI, A.C. Astrócitos imunorreativos à proteína glial fibrilar ácida (GFAP) em sistema nervoso central de equinos normais e de equinos com leucoencefalomalácia. **Pesq. Vet. Bras.**, vol.19, n.3-4, p.104-108, 1999.

MACHADO, G.F.; LEMOS, K.R.; ALESSI, A.C. Aspectos sobre a distribuição de astrócitos e reação astrocítica em algumas afecções neurológicas dos animais domésticos. In: Encontro nacional de patologia veterinária, 6., 1993, Santa Maria. **Anais do VI encontro nacional de patologia veterinária**. Santa Maria, 1993. p.08

MACHADO, G.F.; ALESSI, A.C. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactive astrocytes in the SNC of normal and rabies-infected adult cattle. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.34, n.6, p.345-348, 1997.

MACHADO, G.F. **Papel do IFN- γ e do TNF- α na imunopatologia da encefalite experimental induzida pelo vírus da estomatite vesicular em camundongos C57Bl6**. 1999. 129f. Tese (Doutorado em Patologia)-faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1999.

MACHADO, A.B.M. Tecido nervoso. In:_____.**Neuroanatomia funcional**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p.17-34

MAZZUCATO, B.C.; ALESSI, A.C. Experimental encephalitis by vesicular stomatitis vírus. **Acta Microsc.**, s. C, p.175-176, 2001.

McDERMOTT, K.W.G.; LANTOS, P.L. The distribution of glial fibrillary acidic protein and vimentin in postnatal marmoset (*Callithrix jacchus*) brain. **Dev. Brain. Res.**, v.45, p.169-177, 1989.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC) – **Nutrient Requirements of Poultry**. 9.ed. Washington: National Academic Press, 1994. 155 p.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger principles of biochemistry**. 3.ed. Nova Iorque: Worth Publishers, 2000. 1125 p.

PAGE, R.K.; ROWLAND, G.N.; BUSH, P.B. Encephalomalacia in a flock of broiler breeder hens. **Avian Dis.**, v.25, n.1, p.202-206, 1981.

PAPPENHEIMER, A.M.; GOETTSCHE, M.; JUNGHEIN, E. Nutricional encephalomalacia in chicks and certain related disorders of domestic fowl. **Conn. Agric. Exp. Stn. Bull.**, p. 229, 1939.

PEDRAZA ORDÓÑEZ, F.J.P. **Caracterização imunoistoquímica da reação inflamatória no cérebro de bovinos naturalmente infectados com Herpesvírus Bovino tipo 5 (HVB-5)**. 2003. 40p. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

PETERS, A. et al. **The fine structure of the central nervous system:** neurons and their supporting cells. 3.ed. Oxford: Oxford University, 1991. 494p.

PFEIFFER, B.; MEYERMANN, R.; HAMPRECHT, B. Immunohistochemical co-localization of glycogen phosphorylase with the astroglial markers glial fibrillary acidic protein and S-100 protein in rat brain sections. **Histochem.**, v.97, p.405-412, 1992.

RAMON Y CAJAL, S. Sobre un nuevo proceder de impregnación de la neuroglia y sus resultados en los centros nerviosos del hombre y animales. **Trb. Invest. Biol. Univ. Madrid**, v.11, p.219-238, 1913.

RANDALL, C.J.; WOOD, A.M.; MACKENZIE, G. Encephalomalacia in first-week chicks. **Vet. Rec.**, april 17, p.419, 1993.

RANDALL, C.J.; REECE, R.L. Nervous System. In:_____.**Color atlas of avian histopathology.** Turim: Mosby-Wolfe, 1996. p. 19-34.

RANSOM, B.; BEHAR, T.; NEDERGAARD, M. New roles for astrocytes (stars at last). **Trends Neurosc.**, V.26, n.10, p.520-522, 2003.

REIS, J. **Doenças das aves.** 7.ed. São Paulo: Melhoramentos, 1967. 281p.

SANDBANK, U. et al. Basal membrane labyrinths in the healing stages of chick nutritional encephalopathy. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, v.06, n.1, p.03-08, 1980.

SHIN, D.H.; LEE, E.; CHO, S.S. Glial cells in the chicken optic tectum. **Brain Res.**, v.962, p.221-225, 2003.

STORTS, R.W. Sistema nervoso central. In: CARLTON, W.W.; McGAVIN, M.D. **Patologia veterinária especial de Thomson**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. p.353-416

SUMMERS, B.A.; CUMMINGS, J.F.; de LAHUNTA, A. **Veterinary neuropathology**. Saint Louis: Mosby Year Book, 1995. 527 p.

SWENSON, M.J.; REECE, W.O. **Dukes - fisiologia dos animais domésticos**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 856 p.

VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E.A.M.; CUNHA, D.F.; JUNQUEIRA-FRANCO, M.V.M.; BERNARDES, M.M.; JORDÃO-JR, A.A. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina Ribeirão Preto**, v:31, p.31-44, 1998.

VASCONCELOS, R.O. **Participação da glia nas alterações morfológicas do cérebro e na produção de β -quimiocinas na encefalite experimental pelo vírus da estomatite vesicular em camundongos**. 2003. 92 f. Tese (Doutorado em Patologia Animal)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

VERICEL, E.; BUDOWSKI, P.; CRAWFORD, M.A. Chick nutritional encephalomalacia and prostanoid formation. **J. Nutr.**, n.121, v.7, p.966-969, 1991.

VIOTT, A.M. et al. Encefalomalácia em criação orgânica de frangos – descrição de caso. In: Encontro nacional de patologia veterinária, 11., 2003, Botucatu. **Anais do XI encontro nacional de patologia veterinária**. Botucatu: FUNEP, 2003. p.144.

VIRGINTINO, D. et al. GFAP-immunoreactive perivascular glia in the chick optic tectum. **Eur. J. Hist.**, v.36, n.4, p.445-454, 1992.

WATANABE, K.; OSBORNE, D.; KIM, S. Phagocitic activity of human adult astrocytes and oligodendrocytes in culture. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v.48, n.5, p.499-506, 1989.

WILSON, T. et al. Avian encephalomalacia in Barbados, West Indies: a description of spontaneous field cases with feed analyses. **Trop. Anim. Health. Prod.**, v.10, n.2, p.111-117, 1978.

IX APÊNDICES

Apêndice 01 - Gráficos das médias da massa das aves dos grupos do E3, medidas em grama, até a sexta semana de idade.