

EFFETTO DI UNA MISCELA DI SOSTANZE AROMATIZZANTI E ACIDI ORGANICI CONTRO *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* IN-VITRO

Ghiselli F.¹, Giovagnoni G.¹, Felici M.¹, Tugnoli B.², Piva A.^{1,2}, Grilli E.^{1,3}

¹ DIMEVET – Via Tolara di Sopra, 43, 40064 Ozzano dell'Emilia (BO)
Università degli studi di Bologna (BO), Italia;

² Vetagro S.p.A. - Via Ignazio Porro, 2, 42124 Reggio Emilia (RE), Italia;

³ Vetagro, Inc. - 116 W. Jackson Blwd., Suite #320, 60604 Chicago (IL), USA

Summary

Necrotic enteritis causes economic losses estimated to be up to 6 billion US dollars per year. Clinical and sub-clinical infections in poultry are also both correlated with decreased growth and feed efficiency. Moreover, in a context of increased antibiotic resistance, feed additives with enhanced antimicrobial properties are a useful and increasingly needed strategy. In this study, the protective effects of a blend of thymol and organic acids against the effects of *Clostridium perfringens* type A (CP) on chicken intestinal epithelial cells were investigated and compared to bacitracin, a widely used antibiotic in poultry production. Primary chicken intestinal epithelial cells were challenged with CP for a total time of 3h to assess the beneficial effect of two doses of a botanicals and organic acids containing blend, and compare them with bacitracin. During the challenge different parameters were recorded, such as transepithelial electrical resistance, cell viability, mRNA expression, and reactive oxygen species production. CP induced inflammation with cytokine production and loss of epithelial barrier integrity. It was also able to induce reactive oxygen species production and increase the caspase expression leading to cellular death. The high dose of the blend acted similarly to bacitracin, preventing the disruptive effects of CP and inducing also an increase in zonula occludens-1 mRNA expression. The low dose only partially prevented the disruptive effects of CP but successfully reduced the associated inflammation. This study shows that the usage of thymol combined with two organic acids can protect primary chicken intestinal epithelial cells from CP-induced damages creating a valid candidate to substitute or adjuvate the antibiotic treatment against necrotic enteritis.

INTRODUZIONE

L'industria avicola è affetta da una varietà di agenti patogeni come *Salmonella spp.* [1], *Eimeria spp.*[2], *Clostridium spp.*[3] e molti altri, che sono associati a elevate perdite economiche dovute all'aumento dei tassi di morbilità/mortalità e costi elevati per le strategie di controllo [4]. L'enterite necrotica (NE), provoca perdite economiche stimate fino a 6 miliardi di dollari all'anno [5] ed è una delle malattie ad alto impatto economico più comuni negli allevamenti. L'agente eziologico della NE è il *Clostridium perfringens* (CP), un batterio Gram-positivo, anaerobico, sporigeno, a forma di bastoncino [3,6]. I tipi di CP A, C e G sono di particolare interesse per l'industria avicola perché sono stati associati a malattie nel pollame. Dei sette tipi di CP noti, sia A che G sono i principali agenti causativi di NE [7].

In passato, le malattie intestinali del pollo sono state studiate su modelli cellulari alternativi come fibroblasti, epatociti o cellule di altro tipo [8,9]. Pochi studi riportano gli

effetti di agenti patogeni o infiammazioni direttamente sulle cellule epiteliali intestinali di pollo (cIEC) in vitro [10–13], ma nessuno ha riportato un'indagine dettagliata sui diversi parametri cellulari coinvolti nell'integrità e nell'infiammazione della barriera intestinale. Inoltre, l'uso improprio di antibiotici nelle produzioni animali aggrava il problema dell'antibiotico-resistenza, contribuendo alla perdita di efficacia dei trattamenti antibiotici contro NE e accresce la necessità di trovare soluzioni alternative. In precedenza, Giovagnoni et al. (2019) [14], hanno studiato se gli acidi organici (OA) e i composti naturali identici che si trovano comunemente negli additivi per mangimi potessero essere usati come molecole alternative o adiuvanti insieme agli antibiotici convenzionali contro il CP [14]. Partendo da questo studio, è stata creata una miscela per combinare il potere antimicrobico degli OA con le proprietà antimicrobiche e antinfiammatorie di sostanze aromatizzanti per contrastare gli effetti dell'enterite necrotica nel pollo.

Questo studio mirava a sviluppare e ottimizzare un modello di *challenge in vitro* per studiare gli effetti del CP sulle cIEC e per aiutare a caratterizzare gli effetti benefici e protettivi di alte e basse dosi di una miscela di sostanze aromatizzanti e OA che potrebbero essere usate come alternativa o adiuvante alla bacitracina, in futuro.

MATERIALI E METODI

Sostanze chimiche e reagenti

La miscela di sostanze aromatizzanti e acidi organici è stata testata a due diverse concentrazioni: una dose elevata (H-BLEND) corrispondente a 1300 ppm totali e una dose bassa (L-BLEND) corrispondente a 650 ppm totali.

Generazione del monolayer di enterociti di pollo

Il monolayer di enterociti è stato generato con il protocollo già pubblicato dal nostro gruppo nel 2021 [15].

Valutazione dell'effetto del challenge batterico

Il ceppo batterico utilizzato in questo studio era L' ATCC 13124 *Clostridium perfringens* tipo A (CP).

Il batterio è stato coltivato in terreno RCM a 37°C in condizioni anaerobiche. Per tutti i saggi è stato utilizzato come inoculo iniziale 5×10^5 CFU/mL, come raccomandato dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Per valutare l'effetto del challenge batterico sulle cIEC sono stati utilizzati quattro diversi terreni di coltura cellulare:

- (1) Terreno di coltura senza penicillina/streptomina come controllo negativo (gruppo CTR);
- (2) Terreno di coltura senza penicillina/streptomina contenente CP in fase esponenziale ad una concentrazione di 5×10^5 CFU/mL (gruppo CP);
- (3) Terreno di coltura senza penicillina/streptomina contenente 5×10^5 CFU/mL CP in fase esponenziale e bacitracina 2ppm (Cat. # B0125 - Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA - gruppo BAC), utilizzato come controllo battericida;
- (4) Terreno di crescita senza penicillina/streptomina contenente 5×10^5 CFU/mL CP in fase esponenziale e H-BLEND (gruppo H-BLEND);
- (5) Terreno di coltura senza penicillina/streptomina contenente 5×10^5 CFU/mL CP in fase esponenziale e L-BLEND (gruppo L-BLEND);

cIEC primarie sono state quindi utilizzate per effettuare le analisi riportate di seguito:

- a. Integrità del monostrato: le cIEC sono state coltivate per 7 giorni prima del challenge a 37°C e 5% di CO₂ su inserti Transwell coated con Matigel. Il giorno prima del challenge le cellule sono state adattate durante la notte alle condizioni anaerobiche (100% CO₂) a 37°C. L'anaerobiosi è stata generata in giare con AnaeroGen gas pack (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Il giorno 8, è stata misurata la resistenza elettrica trans-epiteliale (TEER) per verificare l'integrità del monostrato dopo l'adattamento in anaerobiosi, quindi le cellule sono state lavate tre volte con soluzione tampone fosfato per rimuovere la penicillina/streptomina contenuta nel normale mezzo di crescita. Dopo la misurazione della TEER e i lavaggi, è stato eseguito un cambio di mezzo per indurre il challenge, in base ai cinque terreni di coltura (n=6 per ciascun mezzo) elencati all'inizio del paragrafo corrente. Durante il challenge, le cellule sono state mantenute a 37°C e al 100% di CO₂ in una giara con un AnaeroGen gas pack. La TEER è stata misurata 1,5 ore e 3 ore dopo l'inizio della prova. Alla fine del challenge, le cellule sono state raccolte dai filtri per le analisi qPCR.
- b. Saggi di vitalità e produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS): le cIEC sono state coltivate per 3 giorni prima del challenge a 37°C e 5% di CO₂ su una piastra da 96 pozzetti coated con Matrigel. Quindi sono state adattate durante la notte a condizioni anaerobiche (100% CO₂) a 37°C e il giorno 4 sono state usate come descritto per la valutazione dell'integrità del monostrato (n=6 per ciascun mezzo). Durante la prova, le cellule sono state mantenute a 37°C e al 100% di CO₂ in una giara con un AnaeroGen gas pack. La vitalità è stata valutata con il kit Prestoblue (Thermo Fisher Scientific) dopo 1,5 ore e 3 ore dall'inizio del challenge e il test di produzione di ROS CellRox DeepRed (Thermo Fisher Scientific) è stato eseguito solo dopo 1,5 ore a causa del forte effetto citotossico del CP che avrebbe interferito con il corretto rilevamento dei ROS se misurato dopo 3h.

Caratterizzazione e valutazione dell'espressione genica di marcatori di infiammazione e apoptosi

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il kit Nucleospin[®] RNA (Macherey-Nagel) come descritto dal produttore. Dopodiché l'RNA estratto è stato quantificato tramite spettrofotometria (μ Drop[™] Varioskan Lux, Thermo-Scientific) e 500 ng sono stati poi retro-trascritti a cDNA utilizzando il kit iScript[™] cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories), come da specifiche del produttore. La qPCR è stata eseguita utilizzando iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) e i primers dei vari geni sono stati utilizzati ad una concentrazione di 500 nM. Il ciclo di amplificazione prevedeva 5 minuti a 95°C, poi 40 cicli composti da 5 secondi a 95°C e 30 secondi a 60°C. L'elenco dei primers utilizzati è riportato in tabella 1 (Tab 1). I risultati sono stati espressi utilizzando il metodo del $\Delta\Delta C_t$ [16].

	<i>Gene</i>	<i>Sequenza primers (5' -> 3')</i>	<i>Lunghezza prodotto (bp)</i>	<i>Accession N.</i>
Tight Junctions	Zonula occludens-1	F: TCTGCACAGTGAGGTTGGCT R: GGCTGTCTGCATCGGTGT	145	XM_004934975
	Occludina-1	F: TGCTTTTGCCCAAGCAGGAA R: TGTGGGAGAGGCACCAGTTG	153	NM_204417
	Claudina-1	F: TCGGTGGTGGTCACTTCGTC R: CGCTGATTTACGGGCCGAAC	113	NM_001004768
Citochine	IL1 β	F: TGCCTGCAGAAGAAGCCTCG R: CTCCGCAGCAGTTTGGTCAT	137	NM_204524.1
	IL6	F: GCAGGACGAGATGTGCAAGA R: ACCTTGGGCAGGTTGAGGTT	84	NM_204628.1
	IL8	F: AGCTGCTCTGTGCGAAGGTA R: GCTTGGCGTCAGCTTCACATC	124	NM_205498.1
	INF γ	F: ACAACCTTCCTGATGGCGTG R: AGTTCATTCGCGGCTTTGCG	100	NM_205149.1
Marker infiammatori	iNOS	F: CCCTCCAGCTGATCAGACTATC R: GTGTGCAAGCCGGAATCTTTT	86	NM_204961.1
	Toll-like receptor 4	F: CCTGGGTCTAGCAGCCTTCC R: TGGCCCAGATTCAGCTCCTG	129	NM_001030693
	Caspasi 1	F: CTGTGGGATTCTCCGACCCC R: GCCCTACGGGTTCTGCTCTC	148	XM_040650618
	Caspasi 3	F: TACTCCTGGAGGAACGCAGC R: TGCCACTCTGCGATTTACACG	123	NM_204725.1
	MAPK-1	F: TGTGACTTCGGACTGGCTCG R: AGGAGCCCTGTACCAACGTG	93	XM_015275131
Ref.	RPLP0	F: TCACGGTAAAGAGGGGAGGTG R: CTTGCTCAGTCCCCAGCCTT	143	NM_205179

Tabella 1: Sequenze primers utilizzate per la caratterizzazione biomolecolare. IL=interleuchina; INF γ =interferon-gamma; MAPK=proteina chinasi attivata dal mitogeno; iNOS=Ossido nitrico sintasi inducibile; TLR4=Toll-like receptor 4; RPLP0= proteina ribosomiale acida 60S P0.

RISULTATI

La Figura 1 riporta i valori di TEER misurati a 1,5 e 3 ore dopo l'infezione.

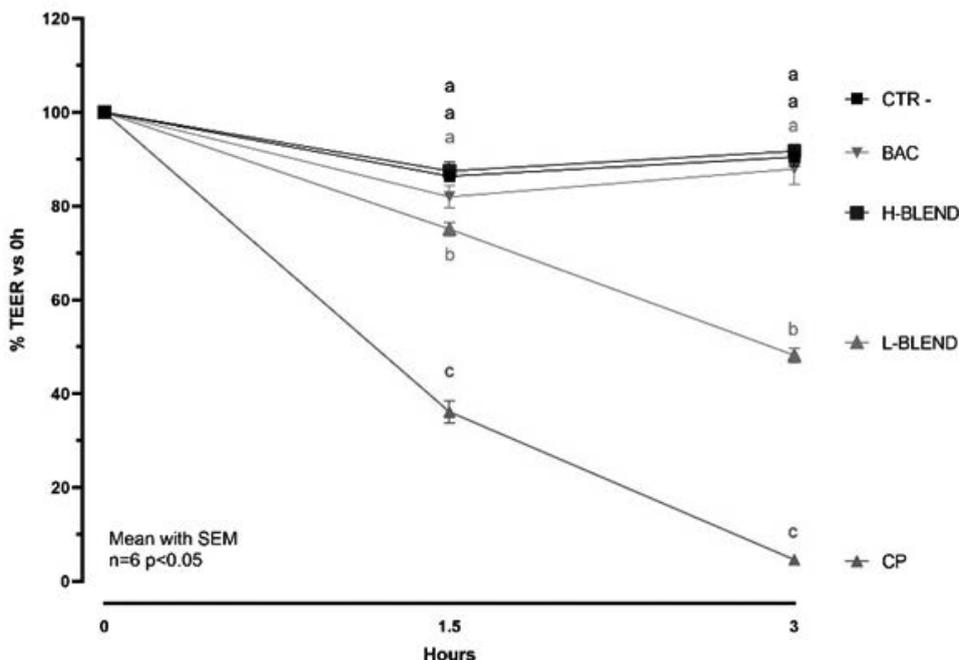


Figura 1: Percentuale di resistenza elettrica trans-epiteliale relativa dopo 1,5 e 3 ore di challenge con *C. perfringens* – CTR = Controllo; CP = *C. perfringens* 5x10⁵ CFU/mL; BAC = bacitracina 2 ppm; H-BLEND = 1300ppm totali; L-BLEND = 650ppm totali - Media con SEM (n=6). Lettere diverse rappresentano differenze significative (p < 0,05); (2-way ANOVA Tukey's multiple comparisons).

CP ha mostrato un forte effetto sulla barriera epiteliale, considerando che è stato in grado di distruggere completamente il monostrato cellulare dopo 3 ore. La bacitracina utilizzata come controllo battericida, ha impedito la diminuzione della TEER che è rimasta simile al controllo in entrambe le rilevazioni. L'H-BLEND ha protetto le cellule dall'azione di CP in modo simile all'antibiotico, mentre l'L-BLEND ha parzialmente fallito con un calo TEER del 50% dopo 3 ore. Questo risultato è stato confermato anche dal test di vitalità, riportato in Figura 2, che ha mostrato una riduzione della vitalità cellulare, nel gruppo con CP, del 13% dopo 1,5 ore e del 37% dopo 3 ore.

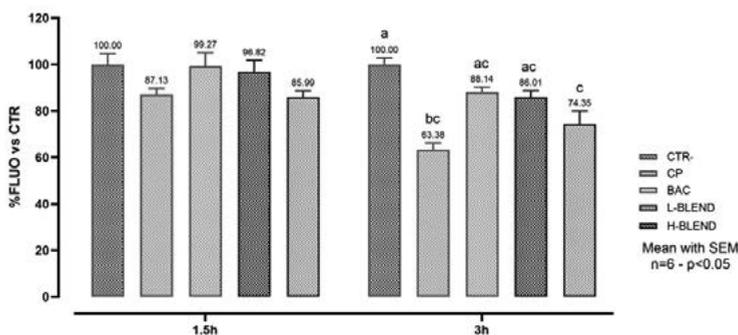


Figura 2: Vitalità cellulare dopo 1,5 h e 3 h di challenge con *C. perfringens* – CTR = controllo; CP = *C. perfringens* 5x10⁵ CFU/mL; BAC = bacitracina 2 ppm; H-BLEND = 1300ppm totali; L-BLEND = 650ppm totali - Media con SEM (n=6). Lettere diverse rappresentano differenze significative (p < 0,05); (2-way ANOVA Tukey’s multiple comparisons).

Bacitracina e H-BLEND hanno impedito la morte cellulare mantenendo valori di vitalità cellulare più elevati. L-BLEND ha registrato una riduzione della vitalità vicino al 26% dopo 3 ore.

La Figura 3 riporta gli effetti del CP sulla produzione di ROS che mostrano un aumento di 20 volte della produzione di ROS nel gruppo con challenge, rispetto al controllo, già dopo 1,5 ore. I livelli di ROS sono stati ridotti di 4 volte dal blend alla concentrazione maggiore (H-BLEND) e solo 2 volte dal blend a concentrazione minore (L-BLEND).

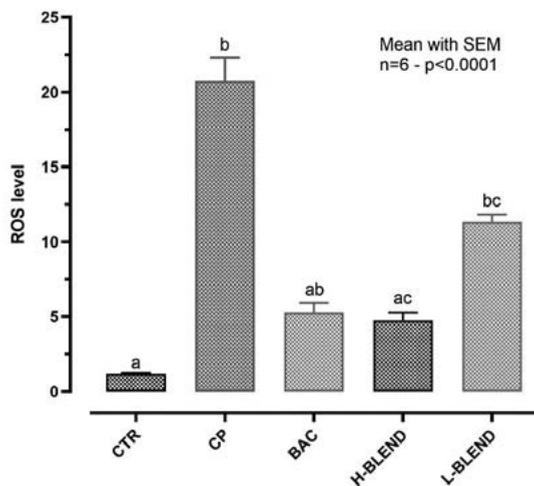


Figura 3: Produzione di ROS dopo 1,5 ore di challenge con *C. perfringens*. Il saggio di produzione di specie reattive dell’ossigeno è stato eseguito solo dopo 1,5h a causa del forte effetto citotossico di CP che interferisce con la corretta rilevazione dei ROS – CTR = Controllo; CP = *C. perfringens* 5x10⁵ CFU/mL; BAC = bacitracina 2 ppm;

H-BLEND = 1300ppm totali; L-BLEND = 650ppm totali - Media con SEM (n=6). Lettere diverse rappresentano differenze significative ($p < 0,0001$); (Kruskal-Wallis test multiple comparisons).

Nella Figura 4 sono riportati i risultati della qPCR. CP ha ridotto l'espressione di Zonula occludens-1 (ZO1) e claudina-1 (CLDN1) e ha aumentato significativamente l'espressione delle citochine pro-infiammatorie: IL1 β (2 volte superiore), IL6 (25 volte superiore), IL8 (60 volte superiore) e INF γ (5 volte superiore). La miscela ad entrambe le dosi ha ridotto significativamente l'espressione di IL1 β , IL6 e IL8. L'H-BLEND è riuscito a ridurre INF γ e aumentare l'espressione di ZO1 rispetto al controllo. La dose minore è stata inefficace contro l'aumento dell'espressione di INF γ e la riduzione dell'espressione di ZO1 e CLND1.

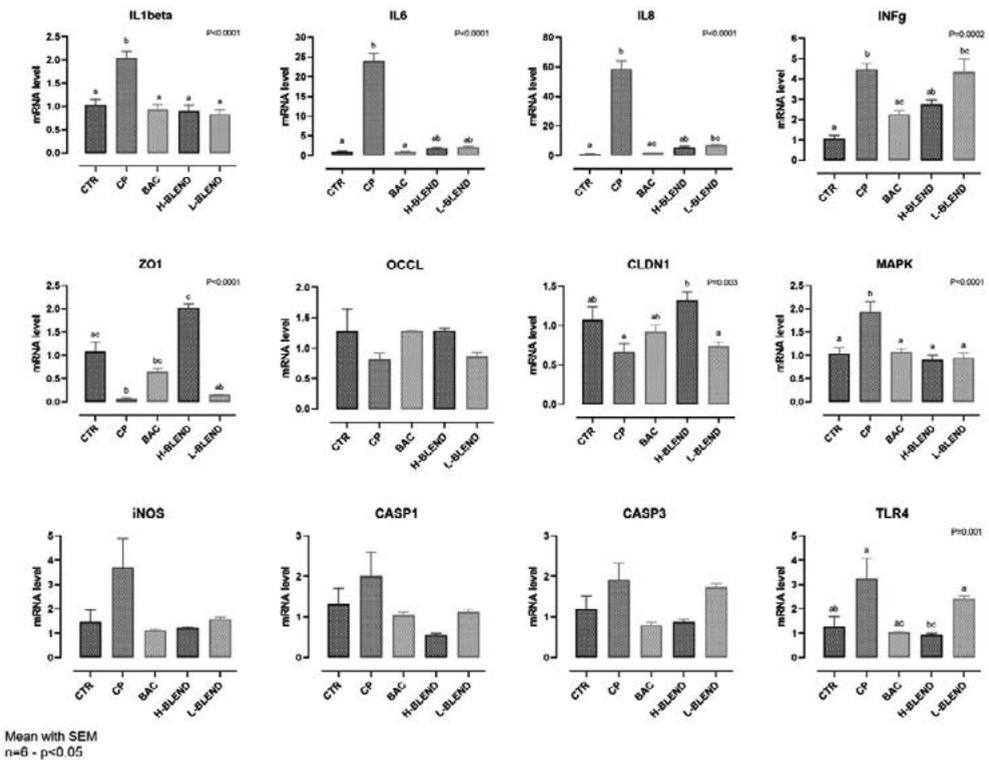


Figura 4: Espressione genica dopo 3 ore di challenge con *C. perfringens* - CTR = Controllo; CP = *C. perfringens* 5x10⁵ CFU/mL; BAC = bacitracina 2 ppm; H-BLEND = 1300ppm totali; L-BLEND = 650ppm totali - INF γ = Interferone γ ; ZO1 = Zonula occludente 1; OCCL = Occludina; CLDN1 = Claudina1; MAPK = protein chinasi attivata dal mitogeno; iNOS = ossido nitrico sintasi inducibile; TLR4 = recettore toll-like 4; CASP1 = caspasi 1; CASP3 = caspasi 3; - Media con SEM (n=6). Lettere diverse rappresentano differenze significative ($p < 0,05$); (one-way ANOVA Tukey's multiple comparisons).

Inoltre, i livelli della ossido-nitrico-sintasi inducibile (iNOS), del toll-like receptor 4 (TLR4), caspasi-1 (CASP1) e caspasi-3 (CASP3) erano numericamente aumentati nelle cellule sottoposte a challenge con CP, rispetto a quelle di controllo (gruppo di controllo negativo e bacitracina). L'H-BLEND è riuscito a ridurre i livelli di questi marcatori molecolari riportandoli ai livelli del controllo.

DISCUSSIONE

L'industria avicola è colpita da diversi agenti patogeni e problemi che causano perdite di miliardi di dollari USA ogni anno [17]. Gli allevatori sono costantemente alla ricerca di modi per migliorare la produttività e ridurre l'impatto di varie malattie. Il CP è l'agente eziologico collegato all'enterite necrotica nel pollo e le prime fasi di NE sono associate a forti reazioni infiammatorie a livello intestinale [6]. Per trovare additivi per mangimi che possano agire contro queste patologie, è necessario sviluppare un modello standardizzato in vitro che consenta uno studio approfondito dei meccanismi patologici legati alla patogenesi del CP. Questo studio mirava a sviluppare e ottimizzare un modello di *challenge in vitro* per studiare gli effetti sulle cIEC del CP e per testare gli effetti protettivi di una miscela composta da sostanze aromatizzanti e acidi organici come alternativa o adiuvante a un antibiotico comunemente usato nelle produzioni avicole. In particolare, l'H-BLEND conteneva una concentrazione inibitoria di OA per confrontare la miscela con la bacitracina. Invece, L-BLEND conteneva una concentrazione sub-inibitoria dei composti per testare un possibile effetto sinergico contro gli effetti indotti da CP sulle cellule.

Per studiare gli effetti di un challenge indotto da CP sulle cellule epiteliali, le cIEC sono state coltivate su inserti Transwell per imitare la barriera intestinale. Il CP ha ridotto i valori TEER fino al 50-80% rispetto al controllo, indicando un effetto distruttivo sulla barriera epiteliale. CP ha fortemente influenzato l'espressione dell'mRNA di ZO1, OCCL e CLDN1. La miscela testata di OA e sostanze aromatizzanti alla dose più alta è riuscita a proteggere la barriera intestinale prevenendo il calo della TEER in modo simile all'antibiotico. È interessante notare che l'H-BLEND ha anche aumentato l'espressione dell'mRNA di ZO1 agendo come agente protettivo e rinforzante. La bacitracina utilizzato alla sua minima concentrazione inibente, invece, ha impedito la caduta di TEER ma senza indurre un aumento dell'espressione dell'mRNA di ZO1. L-BLEND ha protetto solo parzialmente dalla caduta TEER senza purtroppo essere in grado di aumentare l'espressione di mRNA di ZO1.

L'ATCC 13124 *C. perfringens* tipo A utilizzato in questo studio produce alfa tossina (CPA) e perfringolisina-o (PFOA). PFOA e CPA sono due tossine che hanno una forte attività *pore-forming*. Il PFOA agisce sul colesterolo creando buchi nelle membrane contenenti colesterolo [18].

La CPA agisce principalmente sui fosfolipidi come la fosfatidilcolina e può attivare la caspasi-3 causando la morte cellulare [19], e la cascata infiammatoria MEK1/2, ERK1/2 correlato all'attivazione di NF- κ B [20].

Monturiol-Gross e colleghi (2012) riportano che la CPA provoca stress ossidativo e attivazione della via MEK/ERK [21]. Inoltre, le vie MEK1/2 ed ERK1/2 sono antagonizzate dai terpeni e ricoprono un ruolo importante nella generazione di IL8 come riportato da Wang et al., (2006) [22]. Inoltre, in questo studio, è stata osser-

vata l'attivazione di MAPK (ERK2), che si ritiene stabilizzi l'mRNA di IL8 ed è associato alla generazione di ROS [20]. La miscela utilizzata in questo studio ha evidenziato una generazione di ROS fortemente ridotta grazie alle capacità antiossidanti delle sostanze aromatizzanti e all'attivazione della via Nrf2 da parte degli acidi organici [23].

Recentemente Takehara et al. (2021), hanno ipotizzato che CPA e PFOA potrebbero attivare il TLR4 sulle cellule intestinali [25]. Questo risultato è stato osservato anche in questo studio dall'espressione qPCR di TLR4. L'attivazione di TLR4 potrebbe anche essere correlata a un aumento dell'espressione di IL6, IL8 e IL1 β attraverso la via Nf-kB [26]. La miscela utilizzata in questo studio è riuscita a ridurre fortemente l'effetto di CP su quelle tre citochine ad entrambi i dosaggi. È interessante notare che anche la L-BLEND che contiene concentrazioni sub-inibenti dei composti è riuscita a ridurre l'espressione dell'mRNA delle citochine pro-infiammatorie. Ciò indica forti proprietà antinfiammatorie della miscela anche a concentrazioni sub-inibenti.

CONCLUSIONI

Insieme agli acidi organici utilizzati, le sostanze aromatizzanti formano una miscela che ha un forte potere antimicrobico contro il *C. perfringens*, riducendo la carica batterica, proteggendo così dall'infiammazione e dallo stress ossidativo causati dal challenge. Inoltre, la miscela testata ha mostrato effetti antinfiammatori a concentrazione sub-inibitoria, ma senza proteggere completamente la barriera epiteliale. Questi risultati potrebbero essere un interessante punto di partenza per un futuro test degli effetti di questa miscela *in vivo* e candidarla come possibile alternativa alla bacitracina nella produzione del pollame da carne.

BIBLIOGRAFIA

1. Vandeplas S, Dauphin Rd, Beckers Y, Thonart P, Théwis A. Salmonella in Chicken: Current and Developing Strategies To Reduce Contamination at Farm Level. *J Food Prot.* 2010;73:774–85.
2. Huang G, Tang X, Bi F, Hao Z, Han Z, Suo J, et al. Eimeria tenella infection perturbs the chicken gut microbiota from the onset of oocyst shedding. *Vet Parasitol.* 2018;258:30–7.
3. Baba E, Ikemoto T, Fukata T, Sasai K, Arakawa A, McDougald LR. Clostridial population and the intestinal lesions in chickens infected with Clostridium perfringens and Eimeria necatrix. *Vet Microbiol.* 1997;54:301–8.
4. Timbermont L, Haesebrouck F, Ducatelle R, Immerseel FV. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. *Avian Pathol.* 2011;40:341–7.
5. Wade B, Keyburn A. The true cost of necrotic enteritis. *World Poult.* 2015;31:16–7.
6. Paiva D, McElroy A. Necrotic enteritis: Applications for the poultry industry. *J Appl Poult Res.* 2014;23:557–66.
7. Abd El-Hack ME, El-Saadony MT, Elbestawy AR, El-Shall NA, Saad AM, Salem HM, et al. Necrotic enteritis in broiler chickens: disease characteristics and prevention using organic antibiotic alternatives – a comprehensive review. *Poult Sci.* 2022;101:101590.

8. Jagadish B, Saxena M. Salmonella Typhimurium invasion induces apoptosis in chicken embryo fibroblast. *Curr Sci.* 2008;95:512–4.
9. Felici M, Tugnoli B, Piva A, Grilli E. In Vitro Assessment of Anticoccidials: Methods and Molecules. *Anim Open Access J MDPI.* 2021;11:1962.
10. Immerseel FV, Buck JD, Smet ID, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R. Interactions of Butyric Acid– and Acetic Acid–Treated Salmonella with Chicken Primary Cecal Epithelial Cells In Vitro. *Avian Dis.* 2004;48:384–91.
11. Dimier-Poisson IH, Bout DT, Quéré P. Chicken Primary Enterocytes: Inhibition of *Eimeria tenella* Replication After Activation with Crude Interferon- γ Supernatants. *Avian Dis.* 2004;48:617–24.
12. Guo S, Li C, Liu D, Guo Y. Inflammatory responses to a *Clostridium perfringens* type A strain and α -toxin in primary intestinal epithelial cells of chicken embryos. *Avian Pathol.* 2015;44:81–91.
13. Bar Shira E, Friedman A. Innate immune functions of avian intestinal epithelial cells: Response to bacterial stimuli and localization of responding cells in the developing avian digestive tract. Kufer TA, editor. *PLOS ONE.* 2018;13:e0200393.
14. Giovagnoni G, Tugnoli B, Piva A, Grilli E. Organic Acids and Nature Identical Compounds Can Increase the Activity of Conventional Antibiotics Against *Clostridium Perfringens* and *Enterococcus Cecorum* In Vitro. *J Appl Poult Res.* 2019;28:1398–407.
15. Ghiselli F, Rossi B, Felici M, Parigi M, Tosi G, Fiorentini L, et al. Isolation, culture, and characterization of chicken intestinal epithelial cells. *BMC Mol Cell Biol.* 2021;22:12.
16. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif.* 2001;25:402–8.
17. Espinosa R, Tago D, Treich N. Infectious Diseases and Meat Production. *Environ Resour Econ.* 2020;76:1019–44.
18. Yamamura K, Ashida H, Okano T, Kinoshita-Daitoku R, Suzuki S, Ohtani K, et al. Inflammasome Activation Induced by Perfringolysin O of *Clostridium perfringens* and Its Involvement in the Progression of Gas Gangrene. *Front Microbiol* [Internet]. 2019 [cited 2021 Jun 14];10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6823607/>
19. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999;6:99–104.
20. Oda M, Ikari S, Matsuno T, Morimune Y, Nagahama M, Sakurai J. Signal Transduction Mechanism Involved in *Clostridium perfringens* Alpha-Toxin-Induced Superoxide Anion Generation in Rabbit Neutrophils. *Infect Immun.* American Society for Microbiology; 2006;74:2876–86.
21. Monturiol-Gross L, Flores-Díaz M, Campos-Rodríguez D, Mora R, Rodríguez-Vega M, Marks DL, et al. Internalization of *Clostridium perfringens* α -toxin leads to ERK activation and is involved on its cytotoxic effect. *Cell Microbiol.* 2014;16:535–47.
22. Wang Y, DiSalvo M, Gunasekara DB, Dutton J, Proctor A, Lebhar MS, et al. Self-renewing Monolayer of Primary Colonic or Rectal Epithelial Cells. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2017;4:165-182.e7.

23. Ashrafian H, Czibik G, Bellahcene M, Aksentijević D, Smith AC, Mitchell SJ, et al. Fumarate Is Cardioprotective via Activation of the Nrf2 Antioxidant Pathway. *Cell Metab.* 2012;15:361–71.
24. Saleh HA, Yousef MH, Abdelnaser A. The Anti-Inflammatory Properties of Phytochemicals and Their Effects on Epigenetic Mechanisms Involved in TLR4/NF- κ B-Mediated Inflammation. *Front Immunol* [Internet]. 2021 [cited 2022 Apr 5];12. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2021.606069>
25. Takehara M, Kobayashi K, Nagahama M. Toll-Like Receptor 4 Protects Against *Clostridium perfringens* Infection in Mice. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. *Frontiers*; 2021 [cited 2021 Jun 14];11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.633440/full>
26. Nyati KK, Masuda K, Zaman MM-U, Dubey PK, Millrine D, Chalise JP, et al. TLR4-induced NF- κ B and MAPK signaling regulate the IL-6 mRNA stabilizing protein Arid5a. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:2687–703.