JULIANA GARCIA DA SILVA FONSECA

Avaliação dos efeitos sistêmicos de lipopolissacarídeo sobre o eixo neuroimune de frangos de corte

São Paulo

2019

JULIANA GARCIA DA SILVA FONSECA

Avaliação dos efeitos sistêmicos de lipopolissacarídeo sobre o eixo neuroimune de frangos de corte

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Departamento de Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. João Palermo Neto

São Paulo

2019

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3766
FMVZ

Fonseca, Juliana Garcia da Silva
Avaliação dos efeitos sistêmicos de lipopolissacarídeo sobre o eixo neuroimune de frangos de corte / Juliana Garcia da Silva Fonseca. – 2019.
106 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. João Palermo Neto.

1. Neuroimunomodulação. 2. Avicultura. 3. Lipopolissacarídeo. 4. Estresse. 5. Bem-estar animal. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.

São Paulo, 19 de fevereiro de 2019
CEUA N 7245020217

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: João Palermo Neto
Área: Neurociência E Comportamento

Título da proposta: "Avaliação dos efeitos sistêmicos de lipopolissacarídeo sobre o eixo neroimune de frangos de corte".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 004337)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 12/fevereiro/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Após concluir o presente trabalho solicitamos a alteração do título da dissertação, agora mais abrangente e descrevendo melhor as análises realizadas e resultados obtidos. Ressaltamos que trata-se apenas da alteração do título do trabalho. Todos os demais parâmetros se mantém exatamente os mesmos apresentados anteriormente a esta comissão. ".

Comentário da CEUA: "Solicitação de alteração de título aprovada.".

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FONSECA, Juliana Garcia da Silva

Título: Avaliação dos efeitos sistêmicos de lipopolissacarídeo sobre o eixo neuroimune de frangos de corte

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro indispensável a execução deste trabalho, através do processo n^0 2017/02885-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); e do processo n^0 2017/22005-5, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Ao meu orientador, professor João Palermo Neto, por me mostrar o caminho correto e ser um grande exemplo.

A minha mãe Arlete, e minha irmã Juliete por todo apoio e paciência durante estes dois anos.

Aos professores Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes, Antônio José Piantino Ferreira, e Jorge Camilo Flório por toda a ajuda essencial à realização deste projeto.

A Dra. Claudete Astolfi Ferreira, por dividir seu conhecimento, e sempre me oferecer suporte e incentivo.

Aos Doutores Wanderley Moreno Quinteiro Filho e Atílio Sersun Calefi, pela ajuda na concepção, execução e discussão deste trabalho.

A Caroline Pereira por me acompanhar neste caminho.

Aos técnicos do laboratório de Farmacologia e Toxicologia do VPT: Nicolle, Vagner e Herculano.

Aos colegas da pós-graduação por dividir comigo o caminho e torná-lo menos árduo.

"The love for all living creatures is the most noble attribute of man."

Charles Darwin

RESUMO

FONSECA, J.G.D.S. **Avaliação dos efeitos sistêmicos de lipopolissacarídeo sobre o eixo neuroimune de frangos de corte.** [Evaluation of systemic effects of lipopolysaccharide on the neiroimune axis of broiler chickens].2019.106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A avicultura brasileira destaca-se no cenário da agropecuária mundial por sua alta produtividade e grande tecnicidade. Para atingir estes altos níveis produtivos os animais são muitas vezes submetidos a condições estressantes de manejo e que, por isso mesmo, ativam tanto o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) quanto o sistema nervoso autônomo simpático (SNS). O presente trabalho foi realizado para descrever os eventos neuroimunes decorrentes da administração intravenosa de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) em frangos de corte e do manejo dos mesmos para tratamento e coleta de material. Foram realizados sete experimentos para mostrar, sob uma perspectiva de neuroimunomodulação, os efeitos decorrentes da aplicação de estressores infecciosos e/ou físicos sobre o comportamento e sobre as atividades dos sistemas nervoso, endócrino e imune de frangos de corte. Para tanto, frangos de corte foram separados em 3 grupos, sendo submetidos, respectivamente a tratamento com LPS, com NaCl 0,9% ou mantidos sem manipulação (controle: *naive*). A administração de LPS promoveu ativação do SNS e do eixo HHA atuando, desta forma como um estressor infeccioso, isto é, aumentando as concentrações circulantes de corticosterona e de adrenalina nas aves. Os frangos que receberam LPS apresentaram ainda, uma série de comportamentos englobados no rol do que se denomina “comportamento doentio” e que aparece na vigência de processos infecciosos, sendo atribuídos à presença de citocinas pró-inflamatórias no SNC. De fato, os frangos que receberam LPS apresentaram maiores níveis de IL-1 tanto no hipotálamo quanto na hipófise, quando comparadas às aves dos grupos controle e NaCl 0,9%. Estes animais apresentaram, também, maior atividade neural, evidenciada pelo aumento da expressão dos genes c-fos e EGR-1 no hipotálamo. A contenção dos frangos para administração de NaCl 0,9% e posterior coleta dos materiais para análise também provocou alterações comportamentais, nervosas e

imunes em relação aos animais do grupo controle (naíve), evidenciando estes achados que este tipo de manejo é estressor de “per se”.

Palavras-chave: Neuroimunomodulação. Avicultura. Lipopolissacarídeo. Estresse. Bem-estar animal.

ABSTRACT

FONSECA, J.G.D.S. **Evaluation of systemic effects of lipopolysaccharide on the neuroimmune axis of broiler chickens.** [Avaliação dos efeitos sistêmicos de lipopolissacarídeo sobre o eixo neuroimune de frangos de corte.].2019. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Brazilian poultry industry stands out in the agricultural scenario due to its high productivity and technicity. In order to reach such productive levels, the animals are frequently submitted to stressful handling conditions that activate both the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HHA) and the autonomic sympathetic nervous system (SNS). The present work was carried out to describe the neuroimmune events resulting from an intravenous injection of *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) in broiler chickens, and the effects induced by animals management for treatment and harvest of biological samples. Seven experiments were carried out to show, from a neuroimmunomodulation perspective, the effects of infectious and / or physical stressors application on behavior and on the activities of the nervous, endocrine and immune systems of broilers. For this, broiler chickens were separated into 3 groups, respectively, undergoing LPS treatment, 0.9% NaCl administration or kept without manipulation (control: naíve). LPS administration activated the SNS and the HHA axis increasing the circulating concentrations of corticosterone and adrenaline in the birds thus, acting as an infectious stressor. The chickens that received LPS also presented a series of behavioral alterations that are included in the list of what is called "sickness behavior" and that appears in the presence of infectious processes, being attributed to the presence of proinflammatory cytokines in the CNS. In fact, chickens receiving LPS had higher levels of IL-1 in both the hypothalamus and pituitary in relation to birds of the control and 0.9% NaCl groups. These animals also had greater neural activity, evidenced by the increased expression of the c-fos and EGR-1 genes in the hypothalamus. Management of broilers for 0.9% NaCl administration and subsequent collection of samples for analysis also caused behavioral, nervous and immune changes in relation to the animals of the control group (*naive*), thus evidencing this type of handling is stressor itseft.

Keywords: Neuroimmunemodulation. Poultry Science. Lipopolysaccharide. Stress. Animal Welfare.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Principais vias de interação entre os Sistemas Nervoso e Imune..... 26

Figura 2 Representação cronológica do delineamento experimental..... 42

Figura 3 Efeitos da administração intravenosa de solução salina ou de LPS no comportamento de frangos de corte..... 54

Figura 4 Efeitos da administração intravenosa de solução salina ou LPS nos níveis de dopamina e seus metabólitos no hipotálamo de frangos de corte..... 56

Figura 5 Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina nos níveis de serotonina e seu metabólito no hipotálamo de frangos de corte..... 58

Figura 6 Efeitos da administração intravenosa LPS ou de solução salina nos níveis de noradrenalina e seu metabólito no hipotálamo de frangos de corte..... 60

Figura 7 Efeitos da administração intravenosa de solução salina ou LPS nos níveis de catecolaminas da glândula adrenal de frangos de corte..... 61

Figura 8 Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina ou nos níveis plasmáticos de catecolaminas em frangos de corte..... 63

Figura 9 Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina nos níveis plasmáticos de corticosterona em frangos de corte..... 64

Figura 10 Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina na relação heterófilo/linfócito no sangue periférico das aves..... 65

Figura 11 Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina na porcentagem de linfócitos em frangos de corte..... 67

Figura 12 Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina na porcentagem de linfócito T duplamente positivos em frangos de corte..... 68
Figura 13 Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina na porcentagem de linfócito T CD4 positivos em frangos de corte..... 69
Figura 14 Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina na porcentagem de linfócito TCD8 em frangos de corte..... 70
Figura 15 Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina na porcentagem de macrófagos em frangos de corte..... 71
Figura 16 Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina sobre a expressão gênica hipotalâmica das aves..... 73
Figura 17 Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina na expressão gênica hipofisária das aves..... 74
Figura 18 Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina sobre a expressão gênica na glândula adrenal das aves..... 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Descrição dos comportamentos expressos pelas aves e avaliados no presente experimento..... 43

Tabela 2 Sequências de *primers* a serem utilizados para avaliação da expressão de citocinas..... 50

Tabela 3 Avaliação comportamental de aves tratadas ou não com LPS de *E. coli* (0127:B8) ou NaCl 0,9%..... 53

Tabela 4 Efeitos da administração intravenosa de solução salina ou LPS nos níveis de dopamina e de seus metabólitos no hipotálamo de frangos de corte..... 55

Tabela 5 Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina nos níveis de serotonina e de seu metabólito ácido 5-hidroindol, 3-acético no hipotálamo de frangos de corte..... 57

Tabela 6 Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina nos níveis de noradrenalina e de seu metabólito MHPG no hipotálamo de frangos de corte..... 59

Tabela 7 Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina na concentração de catecolaminas na glândula adrenal de frangos de corte..... 61

Tabela 8 Efeitos da administração intravenosa de LPS ou solução salina nos níveis plasmáticos de noradrenalina de adrenalina em frangos de corte..... 62

Tabela 9 Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina nos níveis séricos de corticosterona em frangos de corte..... 63

Tabela 10 Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina na relação heterófilo/linfócito no sangue periférico das aves..... 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
5-HAAIA	ácido 5-hidroindol, 3-acético
ACTH	Hormônio adrenocorticotropo
AP	Área postrema
CD	Cluster de diferenciação
COX	Ciclooxigenase
CRF	Corticotropina
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
DA	Dopamina
DOPAC	ácido 4,4-diidroxifenilacético
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGR1	*early growth response protein* 1
ELISA	Enzyme LinkedImmunono Sorbent Assay
EPI	Adrenalina
HHA	Eixo hipotálamo-Hipófise-Adrenal
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HVA	ácido homovanílico
IEGs	Immediate early genes
IL	Interleucina
LC	Locuscereulus
LPS	Lipopolissacarídeo
MHPG	ácido 3-metóxi-4-hidroximandélico
NFkB	Fator nuclear kappa B

NOR	Noradrenalina
NTS	Núcleo do tracto solitário
OVA	Ovoalbumina
PVN	Núcelo paraventricular hipotalâmico
RVM	Medula rostral ventrolateral
SI	Sistema Imune
SNAS	Sistema nervoso autônomo simpático
SNC	Sistema Nervoso Central
SNS	Sistema Nervoso Simpático
TLR	Toll-like receptor
TNF	Fator de Necrose Tumoral
INF	Interferon

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19

2 REVISÃO DE LITERATURA 22

3. OBJETIVOS 39

OBJETIVO GERAL 39

OBJETIVOS ESPECÍFICOS 39

4. MATERIAIS E MÉTODOS 40

ANIMAIS 40

FÁRMACOS 41

PROCEDIMENTOS 41

Eutanásia e coleta de amostras 41

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 42

Experimento 1: Análise comportamental 42

Experimento 2: Quantificação de monoaminas cerebrais e de seus metabólitos 44

Experimento 3: Quantificação de catecolaminas plasmáticas 45

Experimento 4: Quantificação da corticosterona sérica 46

Experimento 5: Determinação da relação heterófilos: linfócitos circulantes (H/L) 46

Experimento 6: Imunofenotipagem de leucócitos circulantes e esplênicos 46

Experimento 7: Determinação do perfil de expressão de citocinas e de genes de ativação imediata no encéfalo das aves 48

ANÁLISE ESTATÍSTICA 50

5. RESULTADOS 51

EXPERIMENTO 1: AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL 51

EXPERIMENTO 2: QUANTIFICAÇÃO DAS MONOAMINAS CEREBRAIS E DE SEUS METABÓLITOS 55

EXPERIMENTO 3: QUANTIFICAÇÃO DE CATECOLAMINAS PLASMÁTICAS 62

EXPERIMENTO 4: QUANTIFICAÇÃO DA CORTICOSTERONA SÉRICA 63

EXPERIMENTO 5: DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO HETERÓFILOS: LINFÓCITOS CIRCULANTES (H/L). 64

Experimento 6: Imunofenotipagem de leucócitos circulantes e esplênicos 66

Experimento 7: Determinação do perfil de expressão de citocinas e de genes de ativação imediata no encéfalo das aves 71

5 DISCUSSÃO 77

6 CONCLUSÕES 94

Conclusões Específicas 94

Conclusão Geral 95

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 96

1 INTRODUÇÃO

A adoção de um sistema intensivo na avicultura moderna expõe constantemente as aves a estressores como: alta densidade populacional, elevados níveis de amônia, variações bruscas de temperatura ambiente e agentes infecciosos. Em decorrência, são frequentemente relatados distúrbios na atividade do sistema nervoso central (SNC) que culminam em modificações neurais, comportamentais, endócrinas e imunes.

Estudos realizados na área de neuroimunomodulação utilizam classicamente modelos experimentais conduzidos com mamíferos. Recentemente, os efeitos de estressores que impactam os animais de produção vêm chamando a atenção dos pesquisadores, particularmente daqueles que estudos os elos existentes entre neuroimunomodulação, ambiência/ bem-estar animal e avicultura (QUINTEIRO-FILHO, 2013; BORSOI et al., 2015; HONDA et al., 2015; CALEFI, 2016a).

O sistema nervoso autônomo simpático (SNS) e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) são os principais atores da neuroimunomodulação. Durante o estresse, a ativação do SNS promove aumento da liberação de catecolaminas e aquela do eixo HHA estimula a liberação de glicocorticoides na corrente sanguínea. Juntos, estes dois sistemas permitem ao organismo se proteger do potencial lesivo representado pelos estressores, sendo considerados, por esta razão, como integrante das respostas orgânicas adaptativas (BESEDOVSKY et al., 1979; BERKENBOSCH et al., 1987; SHINI et al., 2008b; ALVES et al., 2010).

Entretanto, as catecolaminas liberadas pela ativação do SNS atuam de forma intensa, via ativação de beta-adrenoceptores, modulando a atividade de

células do sistema imune; também a corticosterona, principal corticosteroide liberado pela glândula adrenal das aves, modula de forma intensa a atividade de células do sistema imune. Em conjunto, elas provocam importantes alterações da função imune resultando, entre outros efeitos, na redução da transcrição de citocinas (DANTZER; WOLLMAN; YIRMIYA, 1998; GOEHLER et al., 2000a; ZIEGLER; HERMAN, 2002; JARVIS et al., 2005; SHINI et al., 2008a).

Estressores, sejam eles de origem infecciosa ou física, ativam o eixo HHA e o SNS, de forma que seus efeitos podem ser medidos e monitorados por meio de parâmetros fisiológicos, imunes e comportamentais. Estes parâmetros têm sido empregados como indicativos do estado de bem-estar dos animais, de sua capacidade de resposta a desafios infecciosos e/ou físicos e, até mesmo, dos níveis de produtividade dos plantéis. Em seu conjunto, as alterações do SNS e do eixo HHA produzem efeitos centrais como, por exemplo, aumento de atividade em vias catecolaminérgicas e expressão de genes no SNC; produzem, ainda, outros efeitos como, por exemplo, aumento das concentrações circulantes de catecolaminas e de corticosterona, com reflexos importantes sobre a imunidade.

A administração intraperitoneal de LPS em condições experimentais é um modelo de estressor infeccioso amplamente utilizado em estudos no campo da neuroimunomodulação. Sua administração aos animais desencadeia a biossíntese de citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez ativam a transcrição gênica de outras citocinas no SNC e em órgãos da periferia. Coloca, portanto, os organismos em um estado ativado, pronto para responder a injurias mimetizando, desta forma, os desafios infecciosos enfrentados pela indústria

avícola (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001b; RAETZ; WHITFIELD, 2002; KARROW, 2006; CRUZ-MACHADO, 2010).

Nos últimos anos, as exigências da população em geral e dos criadores em particular em relação às questões ligadas ao bem-estar dos animais de produção e à qualidade dos alimentos de origem animal vêm aumentando de forma progressiva. Torna-se, assim, relevante compreender de forma mais verticalizada as mudanças neuroquímicas, comportamentais, endócrinas e imunes que ocorrem em frangos de corte submetidos a desafios por estressores sejam eles provenientes de erros de manejo ou da presença de patógenos.

O presente estudo pretende esclarecer, dentro de uma perspectiva neuroimune, os eventos que acompanham a exposição intravenosa de frangos de corte ao lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS), descrevendo os efeitos neurológicos, endócrinos, comportamentais e imunes que ele induz nas aves. Pretende, ainda, verificar se a contenção dos frangos para administração intravenosa de NaCl 0,9% e, posteriormente, para coleta de materiais destinados a análises laboratoriais é estressora de “per se”.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A avicultura atinge na atualidade níveis de produtividade elevados, fato que tem permitido o fornecimento de proteína animal de baixo custo tanto para o mercado nacional como para exportação. Estes objetivos vêm se viabilizando por meio do uso de modernos processos de criação animal que possuem como pilares o melhoramento genético, a melhora dos índices sanitários e o investimento em modernas tecnologias relacionadas à formulação de ração e à nutrição animal. Em seu conjunto, estes fatores vêm contribuindo para a elevação dos índices de conversão alimentar, da precocidade, da uniformidade dos planteis e, também, para o aumento da produtividade e das taxas de sobrevivência (TAVARES, 2007; GENTILINI; ANCIUTI, 2013; ABPA, 2016a).

Entretanto, a adoção de um sistema produtivo altamente intensificado tem como consequência a possibilidade de exposição dos animais a diversos tipos de estressores como, alta densidade populacional, elevados níveis de amônia, alterações bruscas de temperatura ambiente e maior exposição a agentes infecciosos. Como resultado, têm sido frequentemente relatados distúrbios na homeostase dos animais e na qualidade da microbiota intestinal dos mesmos (QUINTEIRO-FILHO et al., 2012a; GOMES et al., 2014; CALEFI et al., 2017).

Apesar da grande diversidade de origem, os estressores físicos atuando de forma isolada ou conjunta, modificam a atividade do SNC das aves, aumentando as concentrações de corticosterona e de catecolaminas circulantes e, em decorrência a relação heterófilos/linfócitos no sangue dos animais (SHINI et al., 2008b; CALEFI et al., 2014; CHENG et al., 2014).

Neste contexto, os estudos conduzidos por Hans Selye em 1936 em ratos são considerados pioneiros na análise dos efeitos gerais de “agentes nocivos” sobre a homeostase. Selye sugeriu o desenvolvimento, nos animais que estudou, de uma síndrome chamada de “Síndrome de Adaptação Geral” (SELYE, 1936). Em 1955, mostrou-se que essa síndrome decorria de processos adaptativos ou homeostáticos desencadeados por estímulos externos adversos (frio ou calor intensos, aplicação de choque elétrico nas patas, injúria tecidual, excesso de exercícios, etc.) que tinham em comum o fato de aumentar o tamanho das adrenais e produzir úlcera gástrica. Mostrou-se, também que, se estes estímulos fossem muito intensos ou mantidos por tempo prolongado, eles culminavam por induzir redução do tamanho de órgãos linfóides como timo, baço e linfonodos, fatos estes que representam uma ameaça à vida ou à segurança dos organismos. Esta constatação levou este processo a ser posteriormente denominado de estresse e, ao agente que o desencadeava, de estressor (SELYE, 1955; SZABO; TACHE; SOMOGYI, 2012). Emprestou-se o termo estresse da física de metais.

Neste contexto, designa-se como estressor em biologia, qualquer estímulo (ambiental, psicológico, imune ou comportamental) capaz de gerar uma alteração fisiológica de estresse, mensurável por meio dos níveis de corticosteroides e/ou de adrenalina e noradrenalina circulantes. Em curto prazo, a reação ao estressor é geralmente adaptativa (chamada de euestresse), sendo responsável pela preservação da vida em situações de riscos à integridade física (reação de luta ou fuga). Observa-se nestas condições: hiperglicemia, vasoconstrição, piloereção, midríase, taquicardia e, entre outros, hiperpinéia. No entanto, se o estressor persiste, sua cronicidade desencadeia efeitos adversos

de gravidade diferenciada em função da magnitude e da duração de sua apresentação (WEBSTER; TONELLI; STERNBERG, 2002; PINTO, 2004; ALVES; PALERMO-NETO, 2007). Gera-se, nestas condições estremas gera-se o que se convencionou chamar de distresse.

Os estressores influenciam a atividade do SNC por meio de duas vias principais: a primeira, decorrente de uma resposta nervosa rápida do SNS com consequente liberação de noradrenalina pelas terminações simpáticas e de adrenalina pela medula da glândula adrenal; a segunda relacionada à ativação do eixo HHA, isto é, envolve uma resposta mais lenta e de caráter hormonal. Neste último caso, a liberação de CRH pelo núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) diretamente nos vasos no sistema porta-hipofisário estimula a síntese e secreção de ACTH pela hipófise que, por sua vez, caindo na circulação sanguínea estimula o córtex da glândula adrenal a liberar glicocorticoides na corrente sanguínea. Um mecanismo de retroalimentação (do inglês, *feedback*) exercido pelos glicocorticoides no hipotálamo/ hipófise reduz os níveis de CRH, mantendo-se a homeostase (HERMAN; CULLINAN, 1997; KARROW, 2006; ALVES; PALERMO-NETO, 2007; QUINTEIRO-FILHO, 2013).

A ativação do eixo HHA é um dos principais responsáveis pela regulação imune durante o estresse; atua via liberação de glicocorticoides na corrente sanguínea que, juntamente com as ativações do SNS e das glândulas adrenais - via catecolaminas - reduz a quimiotaxia de neutrófilos e eosinófilos para os focos de lesão e inibe a transcrição de citocinas alterando, assim, a resposta imune/inflamatória (BASSO et al., 2003; ALVES et al., 2010). Os glicocorticoides também reduzem a ativação de leucócitos e a produção de moléculas de adesão e de seus respectivos receptores; diminuem, desta forma a transcrição de fatores

como o NFkB diminuindo, consequentemente, a produção de citocinas e inibindo a ação de enzimas como a fosfolipase A e a COX2, isto é, diminuindo a magnitude da resposta inflamatória (KARROW, 2006; QUINTEIRO-FILHO, 2013).

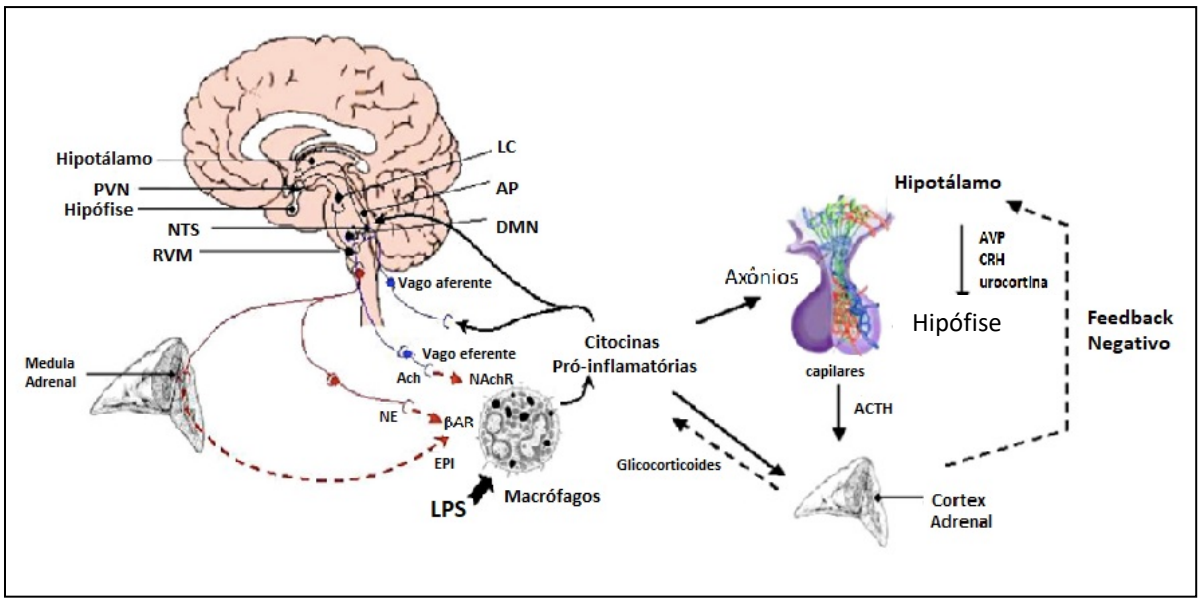
Mais recentemente, mostrou-se que o sistema imune também controla a atividade do SNC por meio de citocinas liberadas durante processos imune-inflamatórios. Besedovsky e seus colaboradores foram pioneiros ao mostrar que as interações neuroimuno-endócrinas são bidirecionais, pois não apenas o SNC influencia a resposta imune por ativação do eixo HHA e do SNS como, em contrapartida, a ativação do SI altera a atividade do SNC e a produção hormonal. Mostraram, de forma muito especial a presença de alterações na atividade de neurônios hipotalâmicos após ativação do sistema imune (SI) por vacinação ou administração sistêmica de lipopolissacarídeo (LPS); evidenciaram, ainda, que os fatos observados eram coincidentes com um aumento nas concentrações séricas tanto de ACTH como de corticosterona (BESEDOVSKY; SORKIN, 1977).

As observações mais recentes da presença de receptores para citocinas, neurotransmissores, hormônios e neuropeptídios em células nervosas e imunes e a produção de citocinas e de neurotransmissores por neurônios e células imunes acabaram por confirmar e reforçar a existência das relações bidirecionais entre os sistemas nervoso e imune (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996). Estavam, assim, solidificadas as bases para o desenvolvimento de uma nova e relevante área do conhecimento denominada de Neuroimunomodulação ou, também de Psiconeuroimunologia.

Mais especificamente, chama-se Neuroimunomodulação a área do conhecimento que estuda as interações imuno-neuroendócrinas, ou seja, os

mecanismos pelos quais os sistemas nervoso e imune trocam informações e controlam-se reciprocamente (ALVES; PALERMO-NETO, 2007). A Figura 1 ilustra estas relações.

Figura 1: Principais vias de interação entre os Sistemas Nervoso e Imune



Legenda: Ativação do sistema Nervoso Central por estressores provenientes do sistema imune, representados pelo LPS. LC= locus coeruleus. PVN=núcleo paraventricular do hipotálamo. RVM=medula rostral ventrolateral. AP=área postrema. NTS= núcleo do trato solitário. NE=noradrenalina. EPI= adrenalina. Adaptado de Karrow, 2006.

Neste contexto, sabe-se, há algum tempo, que a ocorrência de infecções e a consequente ativação do sistema imune altera o comportamento dos animais. Coube, no entanto, a Benjamin Hart, influenciado pelos trabalhos de Selye, descrever em maiores detalhes, as reações comportamentais expressas por animais de laboratório após exposição ao LPS (um polissacarídeo constituinte da membrana externa de bactérias Gram negativas capaz de ativar a resposta imune); Hart denominou ao conjunto destas alterações de “Comportamento doentio” (HART, 1988).

De maneira geral, considera-se que o comportamento doentio caracteriza-se por manifestações comportamentais inespecíficas como letargia, hiper ou

hipotermia (dependendo da gravidade e duração do estímulo), hipofagia ou até mesmo anorexia, redução da atividade exploratória, redução da libido e aumento de sonolência (MENDES; TADEU; BORGES, 2007; DUNN, 2009; ALVES et al., 2010).

De forma interessante, mostrou-se que o comportamento doentio não era decorrência de uma depressão inespecífica do SNC, mas sim de uma redução de atividade em neurônios de áreas do sistema límbico ligadas à motivação. De fato, ratas mantidas em temperatura ambiente muito baixa resgatavam seus filhotes e reconstruíam seus ninhos em tempo menor que aquelas submetidas ao mesmo desafio, mas mantidas em temperatura ambiente variando entre 25 a 30º C (AUBERT et al., 1997; AUBERT, 1999).

Citocinas inflamatórias como a IL-1 têm sido responsabilizadas pelas alterações comportamentais observadas em animais doentes; de fato, a liberação de citocinas na circulação culmina em redução da atividade motora e dos comportamentos exploratório e alimentar dos animais, mecanismos evolutivos que se acredita estejam relacionados à conservação da energia que se faz necessária para a recuperação dos animais enfermos. A IL-1 atua ainda promovendo febre, uma resposta que limita a replicação de patógenos no organismo e aumenta a capacidade do sistema imune de neutralizar estes microrganismos (MCEWEN, 2000; LARSON; DUNN, 2005; STERNBERG, 2006). Neste contexto, mostrou-se que dentre as citocinas pró-inflamatórias, a IL-1 tem um papel fundamental na indução do comportamento doentio, particularmente na redução da atividade motora e do comportamento alimentar (DANTZER, 2008).

Para estudar mais profundamente os efeitos de agentes infecciosos sobre a atividade do eixo HHA e o papel das citocinas no SNC, Dunn e seus colaboradores administraram o vírus da influenza por via intra-nasal em camundongos. Observaram uma correlação direta entre os sintomas da doença e a ativação do eixo HHA; mais especificamente, observaram que à medida em que os animais apresentavam sintomas mais severos de “doença”, aumentavam nos mesmos as concentrações séricas de ACTH e de corticosterona. De relevância, mostraram que os animais apresentavam, ainda, aumento de atividade em vias noradrenérgicas e serotoninérgicas centrais, de maneira muito semelhante aos padrões observados em estudos conduzidos com o emprego de estressores físicos como, por exemplo, após contenção física ou restrição de movimento (DUNN et al., 1989). Mostrou-se, posteriormente, idêntico tipo de respostas após contaminação experimental por agentes infecciosos, como bactérias, vírus e protozoários (BESEDOVSKY; DEL REY, 1996; HONDA, 2013).

Em nossos laboratórios, Basso e colaboradores (BASSO et al., 2003) mostraram um aumento de atividade neural em áreas do SNC diretamente relacionadas com o comportamento ansioso e com a emoção (NPV do hipotálamo e núcleo central da amígdala), após um único desafio oral com ovoalbumina (OVA) em camundongos tornados alérgicos a esse antígeno. Costa-Pinto observou resultados semelhantes após a administração intranasal de OVA em camundongos OVA-sensibilizados (COSTA-PINTO, 2004).

O papel das citocinas na resposta aos estressores infecciosos foi confirmado por Besedovsky (1986) e por Dunn (1992) ao mostrarem efeitos semelhantes aos de estressores físicos após o tratamento de camundongos por via intraperitoneal com IL-1; mais especificamente, relataram aumento nas

concentrações séricas de ACTH e de corticosterona e hipotalâmicas de MHPG e 5-HIAA (principais metabólitos da noradrenalina e da serotonina, respectivamente).

Acredita-se que estes efeitos sejam decorrentes de uma ação direta da IL-1 em receptores presentes em neurônios aferentes ao SNC (em especial, em aferências vagais) que seriam responsáveis pelo reconhecimento da IL-1 liberada por células do sistema imune na periferia (vide Figura 1). A ativação destes receptores, por sua vez, traduziria o sinal recebido para células imunes e neurônios presentes em regiões do SNC, induzindo a síntese e a secreção desta mesma citocina e/ou de neurotransmissores no hipotálamo que, ao aumentar a secreção de CRF ativariam o eixo HHA (BESEDOVSKY et al., 1986; HART, 1988; DUNN et al., 1989; GOEHLER et al., 2000). Nesse sentido, há também relatos que apontam para uma ação central direta da IL-1 secretada na periferia; neste caso, ela adentraria o SNC ao cruzar regiões em que a barreira cérebro-sangue é mais permeável (ZIEGLER; HERMAN, 2002; DA SILVA, 2010). De forma interessante, mostrou-se também que citocinas como a IL-1 podem ser sintetizadas dentro do SNC, podendo ela atuar na modulação de emoções e comportamentos, além de interferir com mecanismos de memória (CHROUSOS, 1995; DANTZER et al., 2008).

Sabe-se que modificações nos níveis e/ou na atividade de neurotransmissores no SNC são fundamentais para modulações comportamentais; por isso, a partir da década de 80, muitos estudos neuroquímicos e/ou etológicos passaram a analisar de forma mais sistemática as respostas aos estressores e o comportamento doentio (DUNN, 2009). Estudos com animais de laboratório mostraram que estressores agudos (como

choque elétrico nas patas ou contenção física), assim como interleucinas, alteram diversos componentes neuroquímicos. De maneira especial, aumentam a atividade dos sistemas noradrenérgicos, dopaminérgicos e serotoninérgicos (LARSON; DUNN, 2001).

Utilizando-se de técnicas altamente sensíveis, como as de microdiálise e voltametria *in vivo*, mostrou-se aumento no “turnover” de noradrenalina (NA), dopamina (DA) e serotonina (5-HT) no SNC de roedores imunologicamente ou fisicamente estressados. As alterações de atividade de vias noradrenérgicas e serotoninérgicas foram relatadas em todo o SNC, devido a uma distribuição mais difusa dos neurônios que contém estes neurotransmissores; entretanto, aquelas relatadas no sistema dopaminérgico foram mais “restritas” às regiões mesolímbicas, mesocorticais e, ainda mais frequentemente, ao sistema nigrostriatal (MILLAN, 2003; DUNN, 2009).

No entanto, além da Il-1, outras citocinas modulam a atividade de vias noradrenérgicas, serotoninérgicas e dopaminérgicas centrais. Mostrou-se que a administração de altas doses de TNF-alfa aumentou o *turnover* de NA e de 5-HT no hipotálamo de camundongos (DUNN, 1992, 1999). De forma similar, Zalcman e seus colaboradores mostraram que a administração sistêmica de IL-2 aumentou o *turnover* de NE e de DA no hipotálamo de camundongos BALB/c (ZALCMAN et al., 1994; DUNN, 2006, 2009; ALVES et al.,2010). Em condições experimentais *in vitro*, mostrou-se que o IFN-α reduz a expressão de receptores de serotonina em várias linhagens de células neurais, sendo este efeito revertido pela incubação prévia dos neurônios com fármacos antidepressivos como, por exemplo, com fluoxetina (CAI et al., 2005; DANTZER et al., 2007). Experimentos

como este abriram uma avenida de investigações a respeito de uma possível relação causal entre citocinas e depressão.

As citocinas anti-inflamatórias são importantes mediadores da resposta inflamatória no SNC, regulando a intensidade e a duração do comportamento doentio, via inibição da produção das citocinas pró-inflamatórias e, consequentemente, da diminuição de suas vias de ativação e de sinalização. Em particular, mostrou-se que a administração de IL-10 diretamente no SNC diminuiu a expressão do comportamento doentio induzida pela injeção sistêmica de LPS (LEON et al., 1999; CAPURON; DANTZER, 2003; DANTZER et al., 2008). De maneira semelhante, a administração intraperitoneal de LPS em camundongos deficientes em IL-10 resultou em um aumento na expressão de comportamento doentio, fato este associado a um aumento concomitante da expressão de citocinas pró-inflamatórias em regiões do SNC dos animais, em comparação com animais *wildtype* (LEON et al., 1999). Estes dados corroboram com a ideia de que o equilíbrio natural entre as citocinas pró e anti-inflamatórias no SNC, assim como em órgãos periféricos, regula a intensidade e a duração das respostas aos estressores infecciosos (CONTI et al., 2003; DUNN, 2009; SUNDMAN et al., 2011).

A evolução temporal da resposta neuroquímica à injeção de LPS diretamente no SNC variou conforme o tipo de neurotransmissor analisado. Em roedores, a resposta noradrenérgica teve seu pico de atividade registrada 2 horas após o estímulo, estando completamente dissipada 4 horas após a exposição; o aumento dos níveis de serotonina e de 5-HIAA, por outro lado, começou a ser observado mais tardiamente uma vez que o pico máximo de concentração ocorreu 6-8 horas após a exposição ao LPS, dissipando-se mais

lentamente que o relatado para a noradrenalina. Estes fatos sugerem que as repostas neuroquímicas ao LPS envolvem diferentes mecanismos (SAWCHENKO et al., 1983; BREBNER et al., 1999; DUNN, 2009).

Recentemente, estudos realizados em nossos laboratórios por Calefi e seus colaboradores mostraram que a resposta neuroquímica em aves segue padrões semelhantes às respostas observadas em mamíferos. Aves cronicamente estressadas por calor e desafiadas por *C. perfrigens* apresentaram perfil neuroquímico consistente com a expressão de comportamento doentio. Mais especificamente, observou-se um aumento da concentração de serotonina na região rostral do pálio (*pallium* rostral) e redução desta monoamina no hipotálamo; mostrou-se, também no trabalho um aumento da atividade catecolaminérgica (indicada pelo aumento do metabólito MHPG) e aumento no "turnover" de dopamina no hipotálamo (CALEFI et al., 2019).

Além de alterar o padrão neuroquímico, mostrou-se que estímulos infecciosos também alteraram a modulação da expressão dos genes de ativação imediata (do inglês "*immediate early genes*" - IEGs) no SNC. Os IEGs foram descritos como uma classe de genes expressos de forma rápida e transitória em diferentes áreas do SNC após estimulação específica. Os produtos proteicos de IEGs constituem importantes ferramentas para mapeamento da atividade funcional do SNC; de fato, fazem parte da resposta celular aos estímulos ambientais (DRAGUNOW et al., 1994; PRADO; BEL, 1998; SLATTERY et al., 2005).

Os IEGs codificam fatores de transcrição que podem ser induzidos e que controlam a transcrição de inúmeros genes, como por exemplo, o c-Fos e o EGR1. O c-Fos é um proto-oncogene da classe dos IEGs que codifica a proteína

fos. Já foi demonstrado que a ativação da proteína fos por estímulos como: estressores, convulsões ou nocicepção, ocorre principalmente em estruturas do encéfalo envolvidas com respostas emocionais e, em particular, com aquelas que participam do componente afetivo da dor (DRAGUNOW et al., 1994; PRADO; BEL, 1998; WINDLE et al., 2004; XIE et al., 2010). Em nossos laboratórios Basso e colaboradores mostraram ativação de c-Fos no núcleo central da amigdala e no núcleo paraventricular do hipotálamo após administração oral de OVA em camundongos OVA-sensibilizados (BASSO et al., 2003).

Já a proteína EGR1 (do inglês: *early growth response protein*1) atua como um fator de transcrição associado a alterações de homeostasia ou plasticidade neural. Relatou-se que a expressão basal desta proteína ocorre durante a neurogênese e, também, que ela se manifesta após injúria cerebral em animais adultos. Sua atividade tem sido ainda relacionada à regulação da exocitose na fenda sináptica, sendo considerada um mediador das respostas neurais (KNAPSKA; KACZMAREK, 2004).

Neste sentido, tanto o c-Fos quanto o EGR1 têm sido amplamente utilizados para o estudo das respostas neurais aos estressores (DRAGUNOW et al., 1994; LIM; JAIN; CAO, 1998; BASSO et al., 2003; SLATTERY et al., 2005; CÉSPEDES, 2007). Os dois genes são considerados ferramentas que refletem a atividade neural devido a capacidade que têm de regular a transcrição gênica. No entanto, o EGR1 é induzido de maneira mais rápida, tanto por fatores de crescimento quanto por citocinas. De fato, sabe-se que o gene c-Fos demora pelo menos 4 horas para começar a ser expresso no SNC após a exposição a um estímulo (LIM; JAIN; CAO, 1998; SLATTERY et al., 2005).

Os estudos realizados na área de Neuroimunomodulação raramente têm como objeto os animais de produção. Entretanto observa-se na atualidade um crescente interesse pelos elos existentes entre Neuroimunomodulação, ambiência e produção animal, especialmente em avicultura e suinocultura (QUINTEIRO-FILHO, 2008; CALEFI et al., 2016a; QUINTEIRO-FILHO et al., 2017). Recentemente, até mesmo o desenvolvimento de bactérias resistentes a antimicrobianos tem sido relacionado ao excesso de uso destes medicamentos em função de desbalanços imunes decorrentes de estressores de manejo; acredita-se que em suinocultura os estresses de manejo estejam relacionados, entre outros, à superlotação, desmame precoce e mistura de animais de diferentes origens, todos com reflexos na homeostase intestinal (WORLD ANIMAL PROTECTION, 2018).

De modo semelhante ao que ocorre com as células imunes de mamíferos, células de origem linfóide e não-linfóide são responsáveis pela defesa imunológica específica e não específica de animais de produção e, dentre eles, das aves. O heterófilo aviário tem função homóloga ao leucócito polimorfonuclear de mamíferos, atuando predominantemente na mediação da inflamação aguda por meio da fagocitose de microrganismos (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; VILA; FIORAVANTI, 2013). Os linfócitos respondem a uma variedade de estímulos e deslocam-se para os órgãos linfóides secundários onde realizam a apresentação de antígenos após serem desafiados por antígenos bacterianos como, por exemplo, pelo LPS (HECKERT; ESTEVEZ, 1998; MASHALY et al., 1998; LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; EL-LETHEY; HUBER-EICHER; JUNGI, 2003; SHINI et al., 2008a, 2008b, QUINTEIRO-FILHO et al., 2010, 2012b).

Estudos já desenvolvidos na área de Neuroimunomodulação mostraram que frangos estressados apresentaram menores índices de desempenho zootécnico, depressão do sistema imune e comportamento doentio (HECKERT; ESTEVEZ, 1998; MASHALY et al., 1998; SHINI et al., 2008b; QUINTEIRO-FILHO et al., 2010, 2012a, CALEFI et al., 2012, 2017). Evidências disponíveis atualmente sugerem que frangos de corte respondem aos estressores ambientais por meio de mudanças comportamentais, hormonais e fisiológicas (DEBUT et al., 2005). Korte e seus colaboradores mostraram que a aplicação do estresse de contenção em aves de postura da linhagem White Leghorn alterou de forma significante os níveis de corticosterona e de catecolaminas no sangue das aves (KORTE et al., 1997).

Observamos, em nossos laboratórios, que o estresse por aumento da temperatura ambiente em frangos de corte afetou os índices zootécnicos e a imunidade dos plantéis, alterando especialmente o ganho de peso, o consumo de ração e parâmetros imunes (QUINTEIRO-FILHO et al., 2012a; CALEFI, 2016a; CALEFI et al., 2017). Mostramos, também, que estresse induzido por alta densidade populacional diminuiu a atividade de macrófagos, aumentou a migração de microrganismos para o fígado das aves, produziu inflamação na mucosa intestinal e reduziu os níveis séricos da imunoglobulina G, em comparação a aves não estressadas (GOMES et al., 2014).

Desafiando experimentalmente aves estressadas com microrganismos observamos que o estresse térmico, tanto por calor quanto por frio, foi capaz de influenciar negativamente a imunidade das aves, ao reduzir o peso relativo de bursa de Fabricius, diminuir a atividade de macrófagos peritoneais e aumentar os níveis séricos de corticosterona, além de produzir enterite caracterizada por

um infiltrado inflamatório linfo-plasmocitário na lâmina própria do jejuno e maior migração dos patógenos para o baço das aves (QUINTEIRO-FILHO et al., 2010, 2012a, 2017, CALEFI et al., 2012, 2016b, 2017; BORSOI et al., 2015; HONDA et al., 2015).

Alguns trabalhos mostraram que aves que receberam LPS em condições experimentais apresentaram alterações comportamentais, sinais clínicos de doença e alterações no peso relativo de órgãos imunes até 1 hora depois da exposição (JOHNSON et al., 1993; XIE et al., 2000; ROSSI-GEORGE et al., 2005). Estes trabalhos, no entanto, não foram conduzidos dentro de uma perspectiva de Neuroimunomodulação, isto é, relataram os fatos de forma isolada não os relacionando de forma lógica e temporal.

Como já comentado, o LPS é um fosfolipídio encontrado na composição da monocamada externa das membranas da maioria das bactérias Gram negativas, incluindo-se aqui muitos microrganismos patogênicos, como a *Escherichia coli*. De forma mais específica, essa endotoxina é conhecida por ser uma potente ativadora de genes relacionados à resposta inflamatória aguda aumentando a síntese de citocinas durante a fase pró-inflamatória da resposta imune. A possibilidade de gerar novas proteínas amplifica e perpetua, portanto, o sinal inicialmente gerado pelo LPS (CRUZ-MACHADO, 2010).

Nos macrófagos o LPS desencadeia a biossíntese de diversos mediadores da inflamação como, por exemplo, de TNF-α e IL1-β, e ativa a produção de moléculas co-estimuladoras necessárias para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; RAETZ; WHITFIELD, 2002; KARROW, 2006). O NFkB é o fator de transcrição fulcral da resposta inflamatória, sendo expresso tanto na periferia quanto no SNC, nos

macrófagos e nas células da glia, respectivamente. Sua ativação por estímulos inflamatórios como citocinas pró-inflamatórias ou LPS resulta na transcrição de vários genes, levando as células a um estado ativado, prontas para responder a injurias e, também, para gerar outras proteínas que induzem a finalização adequada do processo (CRUZ-MACHADO, 2010).

Diversos estudos demonstraram que a administração sistêmica de LPS alterou a regulação da expressão gênica de citocinas no SNC (DANTZER et al., 2008). Em condições experimentais verificou-se que essa resposta inicia-se minutos após a administração da endotoxina, antes mesmo de que se detecte a presença de citocinas na circulação (GOEHLER et al., 2000; SHERIDAN, 2003; SERRATS et al., 2010). Além disso, mostrou-se que regiões do SNC em que a barreira hemato-encefálica é mais permeável, expressam receptores TLR4 e CD14, da mesma forma como observado nos órgãos circunventriculares - regiões encefálicas com alta vascularização de capilares fenestrados - o que, como se disse, permite a passagem de moléculas que de outra forma não adentrariam outras áreas do cérebro (HERMAN; CULLINAN, 1997; BUTLER; COTTERILL, 2006; DA SILVA, 2010). Nessas áreas, em que a comunicação do tecido nervoso com o sistema vascular é mais acessível, mostrou-se que LPS promove a transcrição de genes para citocinas (RIVEST, 2003; CRUZ-MACHADO, 2010). Em relação à funcionalidade dessa produção central de citocinas desencadeada pelo LPS sugere-se que o processo module tanto a excitabilidade neuronal como os processos de neurodegeneração e/ou de neuroproteção (RIVEST, 2003).

Assim, pela relevância do tema em avicultura pretende-se caracterizar, dentro de uma perspectiva neuroimune, as alterações comportamentais,

neuroquímicas, endócrinas e imunes desencadeadas em frangos de corte pelo desafio com LPS. Acredita-se que a compreensão da presença e da patogênese dos fatores de risco relacionados à imunossupressão seja essencial para o sucesso da avicultura e para a otimização da saúde e do bem-estar das aves, permitindo a utilização de todo o potencial genético e nutricional investido na criação (BROOM, D.M.; MOLENTO, 2004; DAHIYA et al., 2006). Pretende-se, ainda, caracterizar possíveis efeitos decorrentes do estresse de manejo representado pela contenção dos frangos de corte para administrações intravenosas de substâncias químicas como, por exemplo, de LPS e posterior coleta de material; para isto empregou-se a contenção dos animais para administração de NaCl 0,9%.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar dentro de uma perspectiva neuroimune os efeitos da injeção intravenosa de LPS de *Escherichia coli* e da contenção dos animais para administração e coleta de materiais para análises laboratoriais sobre parâmetros comportamentais, neuroquímicos, endócrinos e imunes de frangos de corte.

Objetivos Específicos

Avaliar em frangos de corte e sob uma perspectiva neuroimune, os efeitos da injeção intravenosa de LPS e de NaCl 0,9% estéril sobre:

- O comportamento;
- A concentração de monoaminas e de seus metabólitos no hipotálamo, na hipófise e na glândula adrenal;
- A atividade do eixo HHA e do SNS, quantificando-se os níveis de corticosterona sérica e o de catecolaminas plasmáticas;
- A relação entre heterófilos e linfócitos no sangue circulante;
- A imunofenotipagem de leucócitos circulantes e esplênicos;
- O perfil de expressão de citocinas no encéfalo e na glândula adrenal.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado nas dependências do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade São Paulo, em estrita conformidade com os princípios e diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) como aprovado pelo Comitê de Ética para o uso de animais de experimentação (CEUA) desta faculdade, protocolado sob o número 7245020217.

Animais

Foram utilizados 120 pintinhos com 1 dia de vida, da linhagem Ross® obtidos de incubatório comercial. As aves foram alojadas segundo as condições recomendadas para a espécie durante os primeiros 27 dias de vida. Desta forma, elas foram alojadas em boxes coletivos em uma densidade de 10 aves/m^2. Estes boxes possuíam, inicialmente um sistema de alimentação próprio para pintinhos. A partir do 7º dia de vida e até o final do experimento cada espaço recebeu dois alimentadores tubulares convencionais. Água potável e ração foram fornecidas *ad libitum* em bebedouros pendulares e comedouros tubulares, respectivamente, durante todo o experimento.

No 28º dia de vida os frangos de corte foram separados aleatoriamente em três grupos experimentais com 40 animais cada, a saber:

Controle (*C*): Não receberam qualquer tipo de tratamento;

Salina (S): Tratados, via i.v. com solução de NaCl 0,9%;

LPS (L): Tratados, via i.v.com solução de LPS diluído em NaCl 0,9%.

Fármacos

No 28º dia de vida, os animais do grupo “LPS” receberam 0,2mg/kg de LPS proveniente de *Escherichia coli*, sorotipo 0127:B8 (Sigma Aldrich Inc., St Luis MO) diluído em solução salina estéril. Esta dose foi escolhida segundo dados obtidos de literatura (SHINI et al., 2008a)

Os animais do grupo “Salina” receberam no mesmo dia, idêntico volume (0,2mL/kg) de NaCl 0,9% estéril pela mesma via, de acordo com o protocolo desenvolvido por Shini e colaboradores (SHINI et al., 2008a).

Os animais do grupo “Controle” não receberam qualquer tipo de tratamento, permanecendo nos boxes sem qualquer tipo de manipulação.

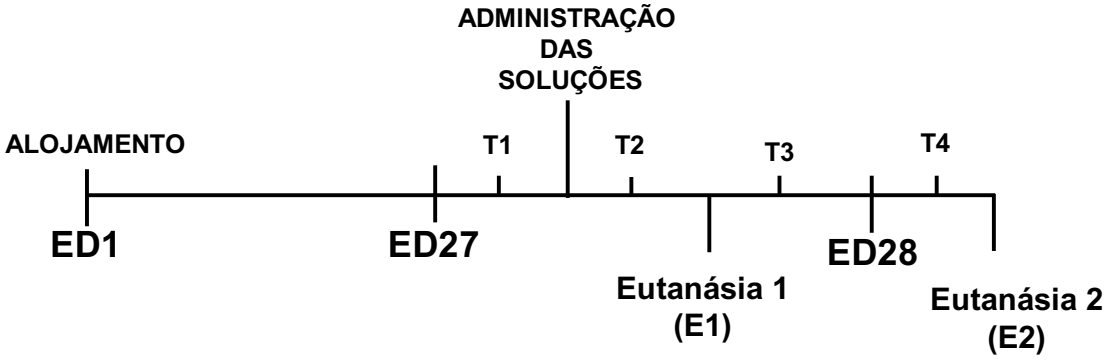
Procedimentos

Eutanásia e coleta de amostras

Transcorridas 3 horas da administração das soluções de LPS ou de NaCl 0,9%, foi realizada coleta de sangue e logo após, abateram-se 20 aves de cada um dos 3 grupos (eutanásia 1). A eutanásia dos frangos foi realizada por meio de deslocamento cervical, método que concorda com recomendações da Resolução Normativa do CONCEA. Imediatamente após a eutanásia, os frangos foram individualmente necropsiados para coleta das amostras de tecidos, que foram imediatamente acondicionados e armazenadas de acordo com as exigências de análise a ser realizada.

Este procedimento foi repetido nos 20 animais remanescentes dos 3 grupos, após 24 horas da administração das soluções de LPS ou de NaCl 0,9% nos (eutanásia 2). A eutanásia foi realizada conforme descrito acima. A Figura 2 ilustra estes procedimentos.

Figura 2: Representação cronológica do delineamento experimental



Legenda: Representação cronológica dos procedimentos experimentais. ED1: primeiro dia experimental. ED27: vigésimo sétimo dia experimental. ED28: vigésimo oitavo dia experimental. E1: primeira eutanásia. E2: segunda eutanásia. T1: primeira avaliação comportamental. T2: segunda primeira avaliação comportamental. T3: terceira avaliação comportamental. T4: quarta avaliação comportamental.

Delineamento Experimental

Experimento 1: Análise comportamental

A avaliação do comportamento dos animais foi realizada conforme protocolos recomendados pelo Animal *Welfare Indicators* (AWIN, 2015), *Welfare Quality* (QUALITY WELFARE, 2009) e, também, conforme propostas constantes de trabalhos realizados por Baert e seus colaboradores, adaptados às nossas condições experimentais (BAERT et al., 2005; CALEFI et al., 2016a).

Desta forma, avaliou-se o comportamento das aves dos 3 grupos, por meio de observação direta durante os “períodos experimentais”, registrando-se o comportamento dos animais em sua moradia durante 10 minutos consecutivos em 04 momentos (períodos experimentais) distintos:

- **T1**: 1 hora antes da injeção das soluções de LPS ou de NaCl 0,9%;
- **T2**: 1 hora após a injeção das soluções de LPS ou de NaCl 0,9%;
- **T3**: 8 horas após a injeção das soluções de LPS ou de NaCl 0,9%;
- **T4**: 24 horas após a injeção das soluções de LPS ou de NaCl 0,9%.

O comportamento das aves foi avaliado e categorizado conforme os parâmetros propostos na Tabela 1; esta tabela apresenta as diferentes categorias de comportamentos avaliados e a descrição que os caracteriza.

Tabela 1: Descrição dos comportamentos expressos pelas aves e avaliados no presente experimento

Comportamento	**Parâmetro**	**Descrição**
Comer	Frequência de alimentação	Ave posicionada em frente ao comedouro, ingerindo alimento.
Beber	Frequência de ingestão hídrica	Ave posicionada em frente ao bebedouro, ingerindo água.
Deitar	Frequência de descanso	Ave em estado de repouso, com o peito e a cabeça sobre a cama.
Parar	Frequência de parada	Ave parada e em estação, sem expressar qualquer outro comportamento.
Andar	Frequência de locomoção	Ave caminhando.
Limpar penas	Frequência de limpeza	Ave realizando autolimpeza ou arrumando suas penas.

Legenda: Comportamentos observados para quantificação do nível de bem-estar das aves.

Estes parâmetros foram escolhidos, uma vez que permitem a quantificação da expressão de comportamentos indicativos do nível de bem-estar dos animais, assim como da expressão do chamado “comportamento

doentio” em aves. Os parâmetros foram quantificados e comparados de acordo com o número de vezes que cada ave de um mesmo grupo realizou um determinado tipo de comportamento, ou seja, a frequência de sua expressão. Os dados foram expressos como a somatória da frequência de expressão do comportamento de todas as aves do grupo, naquele momento.

Para evitar observações comportamentais subjetivas e verificar a adequação das definições dos comportamentos analisados, três avaliadores distintos (todos familiarizados com o comportamento de frangos de corte e cegos aos tratamentos realizados) analisaram o comportamento das aves, atribuindo em tabelas, notas a cada comportamento expresso pelos frangos durante estas janelas de tempo de observação. Os dados registrados individualmente por eles foram submetidos a estudos de correlação para avaliar a acuidade do sistema de escores atribuído. Como se verá em RESULTADOS, as correlações entre os dados registrados de forma independente por estes 3 pesquisadores foram positivas. Portanto, os parâmetros comportamentais medidos foram objetivos.

Experimento 2: Quantificação de monoaminas cerebrais e de seus metabólitos

Para a quantificação das concentrações de monoaminas, o cérebro das aves foi removido do crânio imediatamente após a eutanásia, sendo lavado com solução de NaCl 0,9% gelada (4ºC) e, imediatamente dissecado sobre placa de gelo, rodeado por gelo seco para a remoção do hipotálamo. As amostras de tecido coletadas foram individualmente colocadas em tubos de polipropileno do tipo “eppendorf”, sendo estocadas em nitrogênio líquido, a -80ºC. As monoaminas dopamina (DA) e os seus respectivos metabólitos ácido

homovanílico (HVA) e ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC); serotonina (5-HT) e seu metabólito ácido 5-hidroindol, 3-acético (5-HAAIA); e, noradrenalina (NOR) e seu metabólito ácido 3-metóxi-4-hidroximandélico (MHPG) foram quantificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), com detector eletroquímico. Os dados foram expressos em ng/g de tecido.

Os resultados obtidos foram, posteriormente, usados para calcular as relações DOPAC+HVA/DA, 5HAAIA/5-HT e MHPG/NOR, empregadas como indicadores da taxa de renovação (*turnover*) de DA, 5-HT e NOR, respectivamente. O Limite de Detecção do método foi de 0,7 ng/g e o de quantificação de 1 ng/g. Os dados foram expressos em ng/g de tecido.

As glândulas adrenais foram dissecadas neste momento, sendo coletadas sob as mesmas condições para quantificação das concentrações de Adrenalina e de Noradrenalina.

Experimento 3: Quantificação de catecolaminas plasmáticas

Amostras de sangue coletadas da veia braquial das aves foram colocadas em tubos de polietileno com EDTA 10% e mantidas em gelo moído até a chegada ao laboratório. Em sequência, estas amostras foram centrifugadas a 2.000 g por 15 minutos a 4ºC, para obtenção do plasma. Imediatamente após a centrifugação, estas amostras foram separadas em alíquotas, que foram congeladas e armazenadas a -80º C até o momento da realização das quantificações. As monoaminas, adrenalina (A) e noradrenalina (NOR) foram dosadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), acoplada a um detector eletroquímico. O Limite de Detecção do método foi de 0,7 ng/mL e o de Quantificação de 1 ng/mL. Os dados foram expressos em ng/mL de plasma.

Experimento 4: Quantificação da corticosterona sérica

Amostras de sangue coletadas da veia braquial das aves foram colocadas em tubos de polietileno e mantidas em gelo moído até a chegada ao laboratório. Em sequência, estas amostras foram centrifugadas a 2.000 g por 15 minutos a 4ºC, para obtenção do soro. Os níveis de corticosterona sérica foram quantificados por meio de um kit comercial de ELISA (Ensaios Arbor, Michigan, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, precedidos pelas diluições padronizadas. A concentração de corticosterona foi determinada com auxílio de uma curva padrão expressa em picogramas de corticosterona por mililitro no soro (pg/mL).

Experimento 5: Determinação da relação heterófilos: linfócitos circulantes (H/L)

Amostras de sangue coletadas da veia braquial das aves foram colocadas em tubos de polietileno com EDTA 10% e mantidas em gelo moído até a chegada ao laboratório. Uma alíquota de 10µL de sangue de cada ave foi utilizada para preparar um esfregaço que foi, posteriormente, corado com kit comercial de corante panótico rápido. A relação H/L foi obtida por meio da divisão do número de heterófilos pelo número de linfócitos, após contagem diferencial de 100 leucócitos em cada esfregaço, conforme método descrito por Siegel e colaboradores (SIEGEL; GROSS, 1983; KODAIRA, PEREIRA; SOARES, 2015).

Experimento 6: Imunofenotipagem de leucócitos circulantes e esplênicos

Para a imunofenotipagem dos leucócitos circulantes, alíquotas de 300µL de sangue total coletado por punção da veia braquial foram transferidas para

tubos de polietileno com EDTA 10% e mantidas em gelo moído até o momento de chagada ao laboratório. Para a fenotipagem dos leucócitos esplênicos, os baços das aves foram coletados imediatamente após a eutanásia, sendo armazenados em meio RPMI 1640 (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) em gelo moído até a chegada ao laboratório. Em sequência, eles foram cortados em fragmentos de aproximadamente 1 mm^3, suavemente triturados com o êmbolo de uma seringa estéril e filtrados por passagem em *cell strainer* com malha de 0,7µm (Becton Dickinson, USA). Os leucócitos viáveis foram contados em hemocitômetro empregando-se o corante azul de tripan para exclusão das células mortas.

Amostras com 1 $x10^6$ células esplênicas e 25µL de sangue total foram tratados de forma tal a provocar a lise das hemácias, pela adição de 5 ml de solução de lise ACK (Thermo Fisher Scientific, USA) durante 5 segundos a 37ºC. Foram realizadas marcações simples empregando-se anticorpos diluídos em 1 a 3 µg em 100 µL de PBS. Empregaram-se marcadores para identificação das subpopulações de macrófagos utilizando-se o marcador MØ/Monócito (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) específico para macrófagos de *Gallus gallus domesticus*, e o marcador da proteína de superfície MHC-II (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA). Subpopulações de linfócitos B e T foram identificadas empregando-se os marcadores Bu1, CD8 e CD4, respectivamente, e em associação ao marcador de leucócitos CD45 (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA).

As amostras contendo as células e os anticorpos foram mantidas em ambiente escuro e a 4°C durante 45 minutos. Após o período de incubação, elas foram lavadas com 2 mL de PBS e centrifugadas a 400 g por 8 minutos. Realizou-

se, então, a marcação múltipla. A aquisição dos eventos foi feita em um equipamento BD FACSCalibur (BD Biosciences CA, EUA). O equipamento está equipado com um laser azul 488 nm, que permite a detecção de três cores (filtros de banda 530/30, 575/26 e 650LP), e um laser de635 nm, vermelho que permite uma detecção de uma cor (filtro 670LP). Foi adquirido um total de 10.000 eventos de cada amostra. A titulação de todos os anticorpos foi realizada antes do experimento para determinação das concentrações ótimas de coloração. Um painel multicolor foi produzido utilizando-se os controles de fluorescência – menos um (FMO), e os controles de isotipo para cada fluoróforo. A análise dos dados obtidos foi realizada empregando-se o software FlowJo v10.0.7 (FlowJo, OR, EUA).

Experimento 7: Determinação do perfil de expressão de citocinas e de genes de ativação imediata no encéfalo das aves

Após eutanásia, o cérebro das aves foi dissecado para coleta do hipotálamo e da hipófise e de uma glândula adrenal como descrito acima. Os tecidos removidos foram acondicionados em solução de RNA *later* (Ambion, USA) e mantidos em temperatura ambiente por 24 horas sendo, posteriormente, armazenadas a -80º C até o memento de seu processamento.

O RNA total foi extraído pelo método orgânico, com auxílio do reagente Trizol (Invitrogem Canada Inc. Burlington, Ont., Canada), conforme método previamente estabelecido em nossos laboratórios (CALEFI, 2016). Em sequência, o RNA foi processado para obtenção do cDNA, utilizando-se para tanto um kit comercial de transcrição reversa, conforme instruções do fabricante (iScript, Biorad, USA).

A quantificação da expressão relativa das citocinas representadas na Tabela 1, foi realizada por meio de técnica de PCR em tempo real. As amostras foram processadas para obtenção do cDNA (1:10 em água tratada com DEPC) sendo quantificadas com auxílio do equipamento QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, Walthran, MA, USA).

De forma breve, as condições de amplificação empregadas foram: pré-incubação por 10 min a 94º C, seguido de 60 ciclos de 95ºC por 10 s; 54º a 64ºC para anelamento por 5 s e aquisição e elongação a 72ºC por 10 s. A análise da curva de *melting* foi realizada em três etapas: 95ºC por 10 s, resfriamento até 55º C por 1 min e aquecimento a 97º C. A média geométrica de dois genes controles endógenos (genes da β-actina e *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase [*GAPDH]) foi utilizada para analisar a expressão relativa de cada gene. Foi empregado o ciclo limiar relativo (C_T) para determinação da expressão do gene alvo em relação ao controle (calibrador). Para cada amostra, a média do C_T do gene alvo foi normalizada utilizando-se a fórmula $\Delta C_T = C_{T\ \text{gene alvo}} - C_{T\text{média GAPDH e β-actina}}$. Para a determinação dos níveis de expressão relativa, a seguinte fórmula foi usada: $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{amostra})} - \Delta C_{T(\text{calibrador})}$; esse valor foi também empregado para o cálculo da expressão relativa, utilizando-se a expressão $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabela 2: Sequências de *primers* a serem utilizados para avaliação da expressão de citocinas.

Gene alvo	**Senso**	**Anti-senso**
IFN-alfa	5'-ATCCTGCTGCTCACGCTCCTTCT-3'	5'-GGTGTTGCTGGTGTCCAGGATG-3'
IFN-gamma	5'-ACACTGACAAGTCAAAGCCGCACA-3'	5'-AGTCGTTCATCGGGAGCTTGGC-3'
IL-1beta	5'-GTGAGGCTCAACATTGCGCTGTA-3'	5'-TGTCCAGGCGGTAGAAGATGAAG-3'
IL-2	5'-TGCAGTGTTACCTGGGAGAAGTGGT-3'	5'-ACTTCCGGTGTGATTTAGACCCGT-3'
IL-10	5'-AGCAGATCAAGGAGACGTTC-3'	5'-ATCAGCAGGTACTCCTCGAT-3'
IL-12	5'-CTGAAGGTGCAGAAGCAGAG-3'	5'-CCAGCTCTGCCTTGTAGGTT-3'
EGR-1	5'-ACTTCATCATCGCCATCCTC-3'	5'-TGGAATTGGGAAATGTTGGT-3'
c-fos	5'-AGCTGGAGGAGGAGAAGTCC-3'	5'-TCGACCTCCTCCTCTTCAGG-3'
Beta-actina	5'-CAACACAGTGCTGTCTGGTGGTA-3'	5'-ATCGTACTCCTGCTTGCTGATCC-3'
GAPDH	5'-GGTGGTGCTAAGCGTGTTAT-3'	5'-ACCTCTGTCATCTCTCCACA-3'

Legenda: Primers utilizados para avaliação da expressão relativa de citocinas e quimiocinas pela técnica de PCR em tempo real (CALEFI, 2016).

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados em um primeiro momento para verificação de serem eles paramétricos ou não, por meio do teste de Bartlet. Em sendo paramétricos, foram analisados por ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni para verificação dos contrastes. Sendo não-paramétricos foram avaliados por meio do teste de Kruskall-Whallis seguido pelo teste de Dunnet. As análises estatísticas foram realizadas empregando-se o software GraphPadPrism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA). Todos os dados obtidos foram avaliados e comparados entre si. As diferenças estatísticas foram consideradas significantes para $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

Experimento 1: Avaliação comportamental

Os resultados das avaliações das frequências de expressão comportamental das aves, feitas por 3 pesquisadores independentes e com experiência no manejo de aves comerciais, empregando como referência o descrito na Tabela 1 apresentaram forte correlação positiva entre si (Teste de correlação de Pearsons: $r = 0.929$; $p<0,0001$). Desta forma e de relevância, mostra-se que o critério de escores atribuídos aos diferentes comportamentos na Tabela 1 foi objetivo, sendo replicável.

Os dados comportamentais obtidos foram paramétricos. Desta forma, a Tabela 3 mostra e a Figura 3 ilustra as médias e os desvios-padrão da somatória das frequências atribuídas a cada parâmetro comportamental avaliado.

Análise estatística dos dados relativos à frequência de alimentação dos animais (Figura 3A) mostrou diferenças significantes entre os grupos. Em especial, observou-se redução significante na frequência de ingestão de ração nas três observações realizadas após a administração de LPS e de salina, quando comparados aos animais do grupo controle ($F_{6,18}=1,86$; $p<0,05$). No entanto, deve destacar-se que não se observaram diferenças significantes entre os dados dos grupos LPS e salina.

Os dados de frequência de ingestão hídrica (Figura 3B) foram peculiares. Curiosamente, as aves do grupo “controle” apresentaram frequência de ingestão hídrica mínima nos períodos experimentais T2 e T3, o que tornou difícil a verificação do efeito do LPS nestes momentos, pois também as aves deste grupo deixaram de ingerir líquido nestes momentos. No período T2, a frequência de

ingestão hídrica foi maior nas aves do grupo “salina”. No período de observação T4 as aves dos grupos “LPS” e “salina” apresentaram consumo menor que aquelas do grupo “controle” ($F_{6,18}$=9,64; p<0,05); porém, nenhuma diferença significante foi observada entre os dados destes dois grupos.

Quanto à atividade motora dos animais, a ANOVA de duas vias para medidas repetidas mostrou um aumento significante na frequência de descanso ($F_{6,18}$=3,41; p<0,05) nos animais que receberam LPS em comparação aos animais do grupo “controle” (Figura 3C). Este aumento foi acompanhado por uma diminuição na frequência de locomoção das aves (Figura 3E) ($F_{6,18}$=12,89; p<0,001); a frequência de parado também foi menor nas aves do grupo LPS (Figura 2D) ($F_{6,18}$=5,21 ; p<0,05), o que significa que os animais deste grupo apresentaram redução de sua movimentação, mas não permaneceram totalmente parados. Finalmente, as aves do grupo LPS não apresentaram comportamento de limpeza nos momentos T2, T3 e T4; a pequena expressão deste comportamento, no entanto, impediu a observação de diferenças significantes entre os grupos.

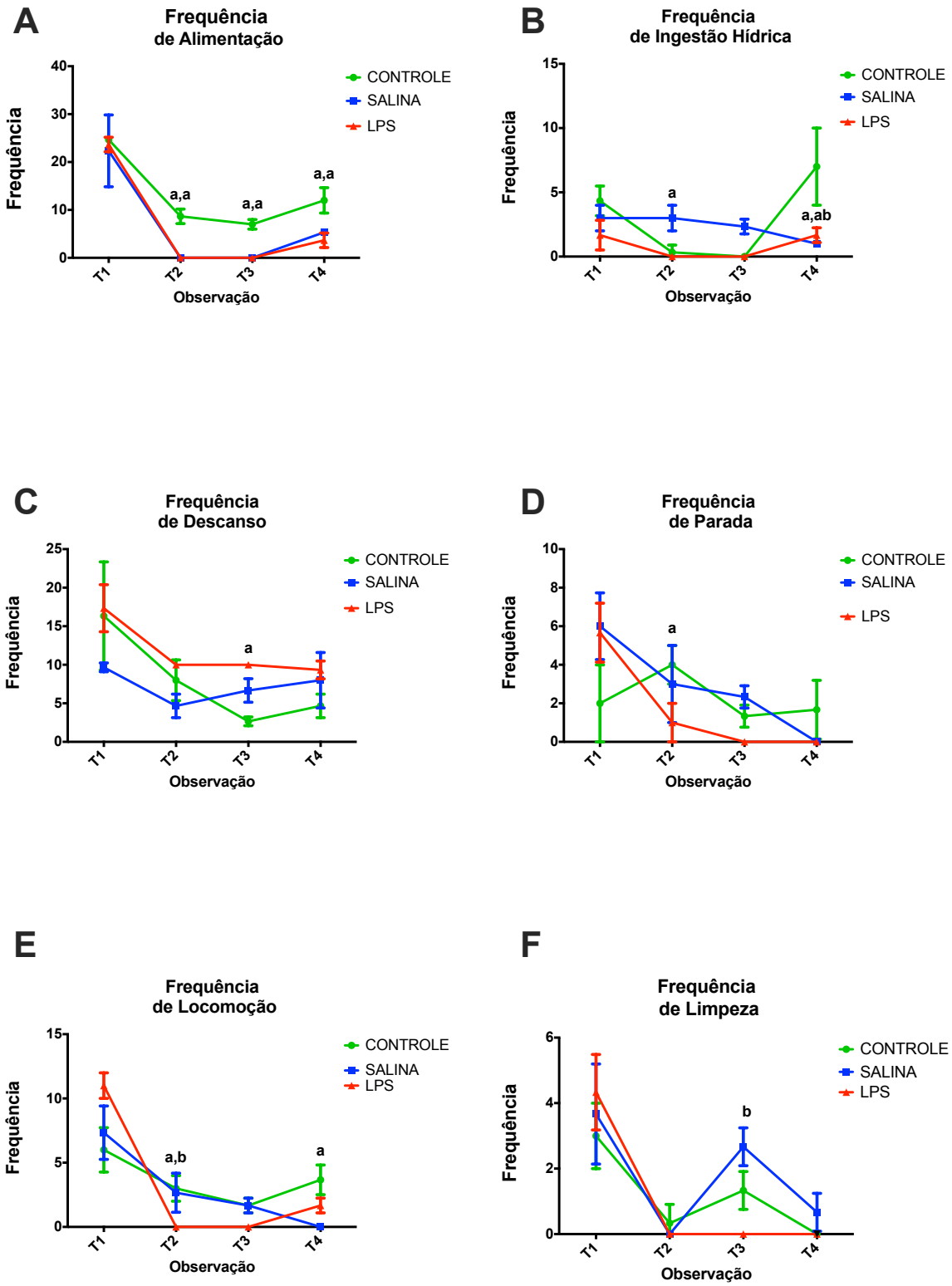
Os dados de frequência de limpeza (Figura 3F) mostraram que os animais do grupo LPS não expressaram este comportamento nos períodos T2, T3 e T4, ao contrário das aves dos outros grupos que o expressaram nos momentos T3 e T4 de observação. Mais especificamente, observamos que a frequência de limpeza das aves do grupo salina foi estatisticamente maior que aquela medida nas aves do grupo LPS no período T3 ($F_{6,18}$=3,90; p<0,05).

Tabela 3: Avaliação comportamental de aves tratadas ou não com LPS de *E. coli* (0127:B8) ou NaCl 0,9%.

	T1			**T2**			**T3**			**T4**		
COMPORTAMENTO	Controle	Salina	LPS	Controle	Salina	LPS	Controle	Salina	LPS	Controle	Salina	LPS
Frequência de alimentação	25±0,47	22±6,13	24±1,25	9±1,25	0±0[a]	0±0[b]	7±0,82	0±0 [a]	0±0 [b]	12±2,16	5±0,47 [a]	4±1,25[b]
Frequência de ingestão hídrica	4±0,94	3±0,82	2±0,94	0±0,47	3±0,82 [a]	0±0 [b]	0±0	2±0,47	0±0 [a]	7±2,45	1±0 [a]	5±0,47 [a]
Frequência de descanso	16±5,75	10±0,47	17±2,49	8±2,16	5±1,25	10±0	3±0,47	7±1,25	10±0	5±1,25	8±2,94	9±0,94
Frequência de parada	2±1,63	6±1,41	6±1,25	4±0,5	3±1,63	1±0,82 [a]	1±0,47	2±0,47	0±0	2±1,25	0±0	0±0
Frequência de locomoção	6±1,41	7±1,7	11±0,82	3±0,82	3±1,25	0±0 [a,b]	2±0,47	2±0,47	0±0	4±0,94	0±0 [a]	2±0,47
Frequência de limpeza	3±0,82	4±1,25	4±0,94	0±0,47	0±0	0±0	1±0,47	3±0,47	0±0,94[b]	0±0	1±0,47	0±0

Legenda: Frequências de expressão comportamental em aves que receberam por via intravenosa solução salina (Salina), 0,2mg/kg de LPS (LPS) ou nenhuma injeção (Controle). São apresentadas as médias e os desvios padrão para cada grupo de animais em cada uma das 4 avaliações: T1= 1hora antes da injeção; T2= 1 hora após a injeção; T3= 8 horas após a injeção; T4= 24 horas após a injeção. a= diferente em relação ao grupo controle T1 com $p < 0,05$; b=diferente em relação ao grupo salina T1 com $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).

Figura 3: Efeitos da administração intravenosa de solução salina ou de LPS no comportamento de frangos de corte



Legenda: Frequências de expressão comportamental em aves que receberam por via intravenosa solução salina (Salina), 0,2mg/kg de LPS (LPS) ou nenhuma injeção (Controle). São apresentadas as médias e os desvios padrão para cada grupo de animais em cada uma das 4 avaliações: T1= 1hora antes da injeção; T2= 1 hora após a injeção; T3= 8 horas após a injeção; T4= 24 horas após a injeção. a= diferente em relação ao grupo controle T1 com $p < 0,05$; b= diferente em relação ao grupo salina T1 com $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).

Experimento 2: Quantificação das monoaminas cerebrais e de seus metabólitos

Os níveis de monoaminas cerebrais e de seus metabólitos, expressos em ng/g de tecido, e as respectivas relações de *turnover* são representados nas Tabelas 4, 5 e 6. Os dados obtidos foram paramétricos.

A Tabela 4 mostra as médias e desvios-padrão das concentrações hipotalâmicas de dopamina (DA), ácido homovanílico (HVA) e ácido 4,4-diidroxifenilacético (DOPAC).

Tabela 4: Efeitos da administração intravenosa de solução salina ou LPS nos níveis de dopamina e de seus metabólitos no hipotálamo de frangos de corte

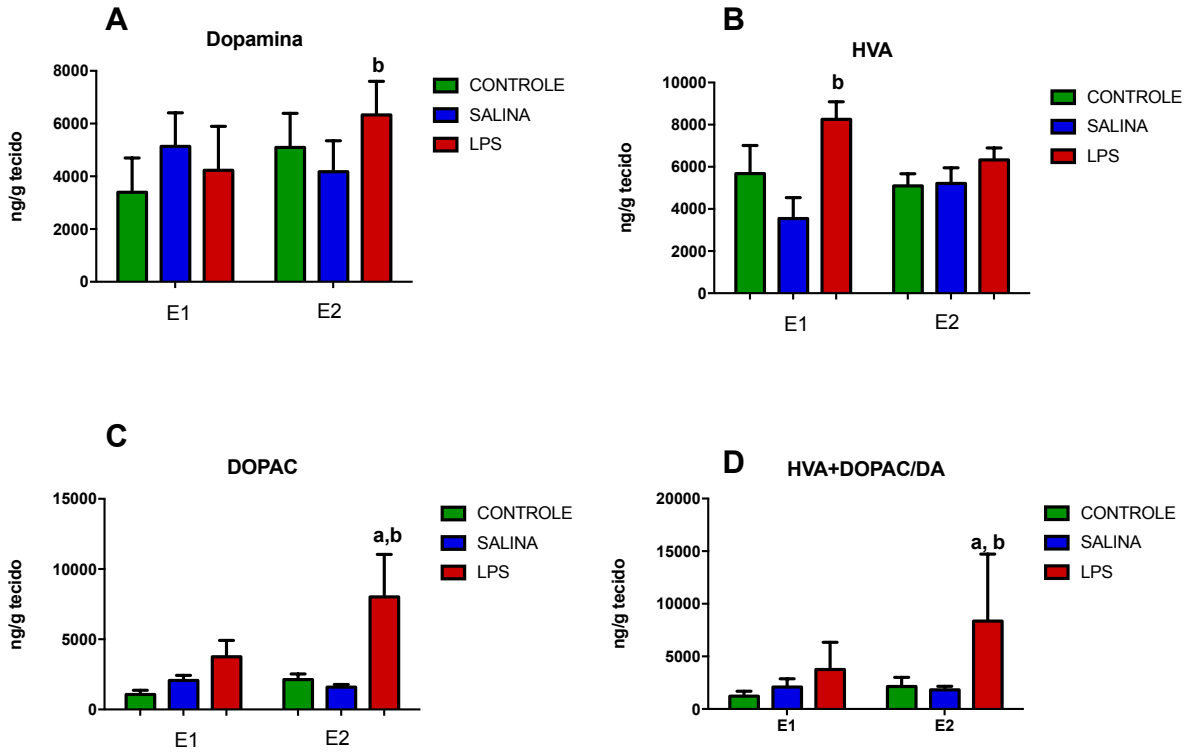
		CONTROLE	SALINA	LPS
DA	Eutanásia 1	33998 ± 1298	5131 ± 1273	4228 ±1670
	Eutanásia 2	5095 ± 1294	4164 ± 1174	6331 ± 1273[b]
HVA	Eutanásia 1	5683 ± 2980	3582± 2222	8254±1871 [b]
	Eutanásia 2	5095± 1294	4648 ± 830	4843 ± 1425
DOPAC	Eutanásia 1	1070± 681	2069± 823	3754±2595
	Eutanásia 2	2134± 879,8	1592 ± 415,1	8023±6752[a,b]

Legenda: Concentração de Dopamina e seus metabólitos no hipotálamo das aves. Dados apresentados em (ng/g de tecido). a= diferente em relação ao grupo controle com $p< 0,05$; b= diferente em relação ao grupo salina com $p< 0,05$ (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).

A Figura 4 representa graficamente as concentrações desta monoamina e de seu *turnover* no hipotálamo. Observa-se um aumento estaticamente significante na concentração de dopamina nos animais que receberam LPS, em comparação aos animais que receberam solução salina 24 horas após estes procedimentos

($F_{2,15}$=2,97; p<0,05), (Figura 4 A). Ao comparar as concentrações de HVA e DOPAC nos animais que receberam LPS com os dados dos outros dois grupos, observa-se um aumento significante na concentração de HVA 3 horas após a administração das soluções ($F_{2,15}$=2.47; p<0,05),(Figura 4 B) e um aumento mais tardio (24 horas após a injeção das soluções) na concentração de DOPAC ($F_{2,15}$= 3,33; p<0,05),(Figura 3 C). Estas alterações nas concentrações hipotalâmicas destes metabólitos resultaram, muito provavelmente, de um aumento estatisticamente significante do *turnover* de dopamina nos animais que receberam LPS em relação aos animais dos outros dois grupos (Figura 4 D).

Figura 4: Efeitos da administração intravenosa de solução salina ou LPS nos níveis de dopamina e seus metabólitos no hipotálamo de frangos de corte.



Legenda: Concentração de dopamina e seus metabólitos no hipotálamo das aves. DA= dopamina, HVA =ácido homovanílico e DOPAC = ácido 4,4-diidroxifenilacético. a= diferente em relação ao grupo controle com p< 0,05; b= diferente em relação ao grupo salina com p< 0,05 (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).

A Tabela 5 mostra as médias e os desvios padrão das concentrações de serotonina (5-HT) e de seu metabólito ácido 5-hidroindol, 3-acético (5HAAIA) no hipotálamo das aves. Os dados são apresentados em ng/g de tecido.

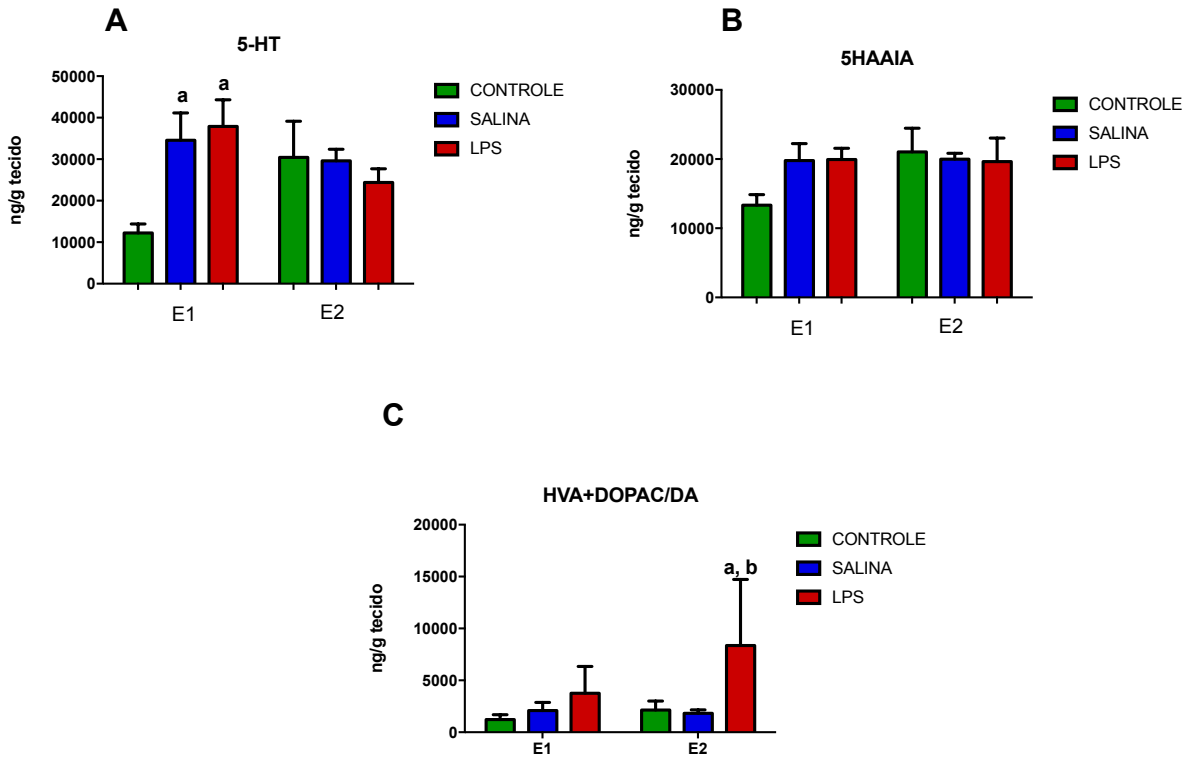
Tabela 5: Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina nos níveis de serotonina e de seu metabólito ácido 5-hidroindol, 3-acético no hipotálamo de frangos de corte.

		CONTROLE	SALINA	LPS
5-HT	Eutanásia 1	12.221 ± 4.888	34.580 ± 14.655 [a]	37.891 ± 14.400 [a]
	Eutanásia 2	30417 ± 19535	29584 ± 6331	24396 ± 7396
5HAAIA	Eutanásia 1	13344 ± 3370	19785 ± 5478	19938 ± 3619
	Eutanásia 2	21037 ± 7637	19990 ± 1891	19636 ± 7586

Legenda: Concentração de Serotonina e seu metabólito no hipotálamo das aves. a= diferente em relação ao grupo controle com $p< 0,05$; b= diferente em relação ao grupo salina com $p< 0,05$ (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).

A Figura 5 representa graficamente as concentrações desta monoamina e de seu metabólito, bem como do seu *turnover*. Observa-se um aumento estatisticamente significante nos níveis de serotonina 3 horas após a injeção das soluções (E1), tanto nos animais que receberam solução salina quanto naqueles que receberam LPS, em comparação com os animais do grupo controle ($F_{2,15}= 4,65$; $p<0,05$), (Figura 5 A). Observa-se, também, um aumento significante do turnover deste neurotransmissor no hipotálamo das aves que receberam LPS e salina ($F_{2,15}=1,32$; $p<0,05$) (Figura 4 C); os níveis do metabólito 5HAAIA, no entanto, mantiveram-se praticamente constantes (Figura 5 B), o que pode indicar redução da liberação do neurotransmissor pela fibra pré-sináptica.

Figura 5: Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina nos níveis de serotonina e seu metabólito no hipotálamo de frangos de corte.



Legenda: Concentração de Serotonina e seu metabólito no hipotálamo das aves. a= diferente em relação ao grupo controle com $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).

A Tabela 6 mostra as médias e os desvios padrão das concentrações de noradrenalina (NOR) e de seu metabólito 3-metóxi-4-hidroximandélico (MHPG) no hipotálamo dos frangos. Os dados são apresentados em ng/g de tecido

Tabela 6: Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina nos níveis de noradrenalina e de seu metabólito MHPG no hipotálamo de frangos de corte

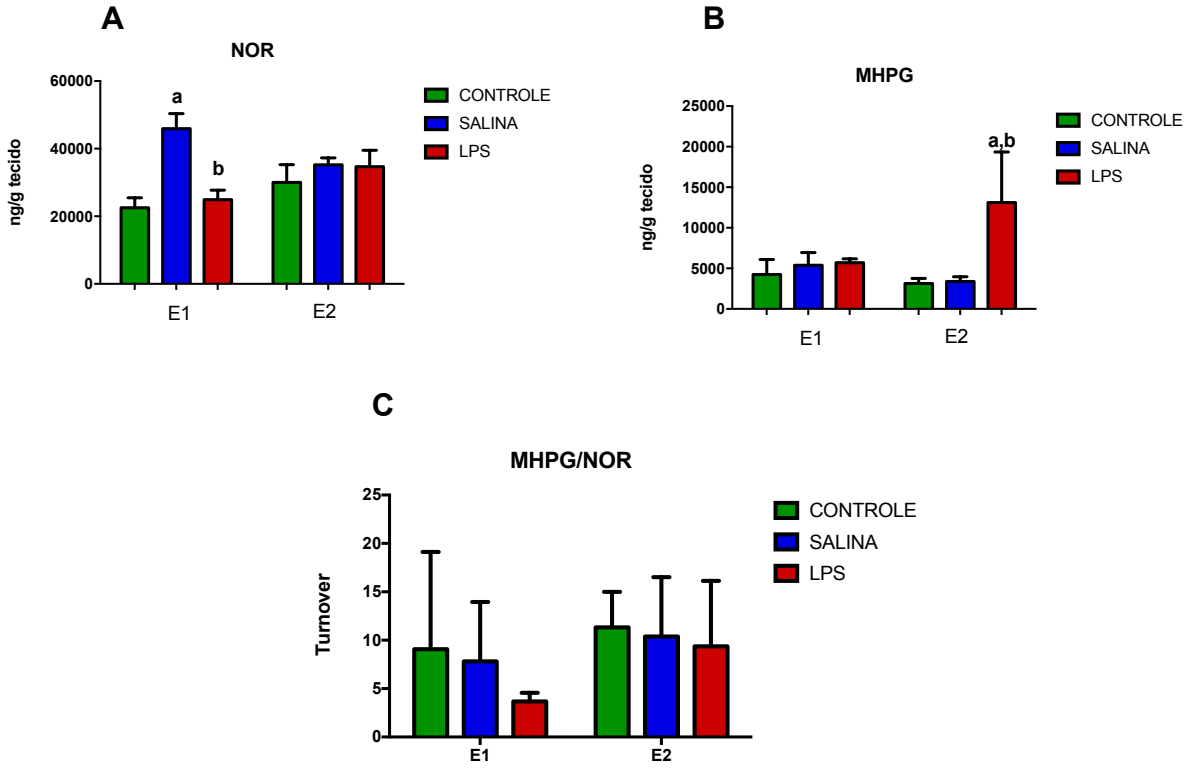
		CONTROLE	SALINA	LPS
NOR	Eutanásia 1	22504 ± 7715	45942 ± 9888 [a]	24911 ± 6273 [b]
	Eutanásia 2	30043 ± 11754	35232 ± 4593	34652 ± 7918
MHPG	Eutanásia 1	4232 ± 4157	5387 ± 3485	5701 ± 1088
	Eutanásia 2	3372 ± 1836	3381 ± 1327	13123 ± 13894 [a,b]

Legenda: Concentração de noradrenalina (NOR) a e seu metabólito MHPG no hipotálamo das aves. a= diferente em relação ao grupo controle com $p< 0,05$; b= diferente em relação ao grupo salina com $p< 0,05$ (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).

A Figura 6 representa graficamente as concentrações de noradrenalina e de seu metabólito assim como o *turnover* deste neurotransmissor no hipotálamo das aves. Observa-se um aumento significante dos níveis de noradrenalina nos animais que receberam solução salina após na primeira eutanásia (E1: 3 horas após a injeção das soluções) em comparação com os animais dos grupos controle e LPS ($F_{2,15}=6,29$; $p<0,05$) (Figura 6 A).

Após a segunda eutanásia (realizada 24 horas após a injeção das soluções) observou-se um aumento na concentração de MHPG nos animais que receberam LPS quando comparados aos dos outros dois grupos (Figura 6 B); este aumento não se traduziu por alteração significante do *turnover* de noradrenalina (Figura 6 C). Apesar de não se ter observado diferença estatisticamente significante entre os dados, observando-se o turnover da noradrenalina com mais acuidade, pode-se notar uma importante tendência de diminuição neste indicador de atividade neuronal 3 horas após a injeção de LPS (Figura 6 C).

Figura 6:Efeitos da administração intravenosa LPS ou de solução salina nos níveis de noradrenalina e seu metabólito no hipotálamo de frangos de corte.



Legenda: Concentração de noradrenalina e seu metabólito no hipotálamo das aves. a= diferente em relação ao grupo controle com p< 0,05; b= diferente em relação ao grupo salina com p< 0,05 (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).

Quantificação de catecolaminas na glândula adrenal

Os dados obtidos foram paramétricos. A Tabela 7 mostra as médias e desvios padrão das concentrações de noradrenalina (NOR) e de adrenalina (ADR) nas glândulas adrenais das aves dos diferentes grupos. Os dados são apresentados em ng/g tecido.

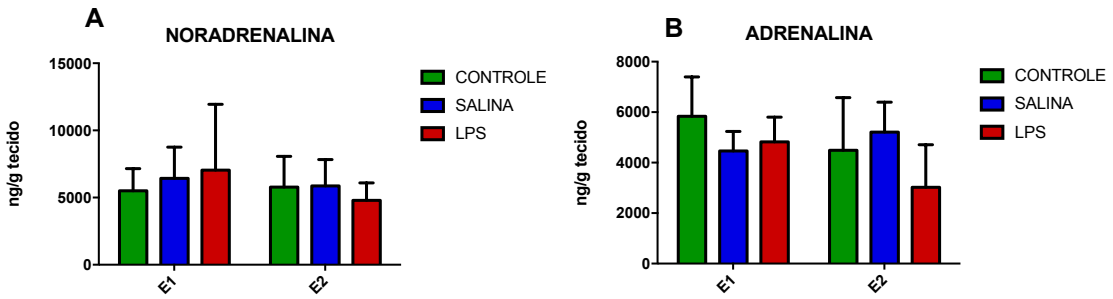
Tabela 7: Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina na concentração de catecolaminas na glândula adrenal de frangos de corte

		CONTROLE	SALINA	LPS
NOR	Eutanásia 1	5508,50 ± 1651,46	6426,15 ± 2332,69	7047,71 ± 4891,80
	Eutanásia 2	5781,60 ± 2284,62	5868,33 ± 1964,48	4794,66 ± 1296,49
ADR	Eutanásia 1	5834,91± 637,07	4466,28 ± 315,64	4821,65 ± 402,02
	Eutanásia 2	4490,46 ± 852,86	5209,30 ± 483,42	3022,25± 689,27

Legenda: Concentração catecolaminas na adrenal das aves. NOR= noradrenalina. ADR= adrenalina. ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni, considerando diferenças estatísticas significantes para p<0,05.

A figura 7 representa graficamente os resultados apresentados na tabela 7. Não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre os níveis de catecolaminas na glândula adrenal das aves, em quaisquer dos momentos avaliados.

Figura 7: Efeitos da administração intravenosa de solução salina ou LPS nos níveis de catecolaminas da glândula adrenal de frangos de corte



Legenda: Concentração catecolaminas na glândula adrenal das aves. NOR= noradrenalina. ADR= adrenalina. ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni, considerando diferenças estatísticas significantes para p<0,05.

Experimento 3: Quantificação de catecolaminas plasmáticas

Os dados obtidos foram paramétricos. A Tabela 8 mostra as médias e desvios padrão das concentrações plasmáticas de noradrenalina (NOR) e adrenalina (ADR) circulantes nos animais dos diferentes grupos nos dois momentos em que foi realizada a coleta de sangue (E1 e E2). Os dados são apresentados em ng/ml de plasma.

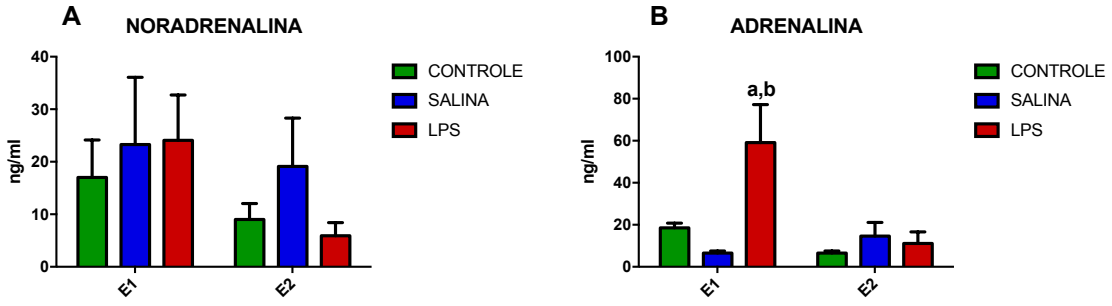
Tabela 8: Efeitos da administração intravenosa de LPS ou solução salina nos níveis plasmáticos de noradrenalina de adrenalina em frangos de corte

		CONTROLE	SALINA	LPS
NOR	Eutanásia 1	17 ± 7,15	23,28 ± 12,81	24,07 ± 8,63
	Eutanásia 2	9 ± 3,05	19,12 ± 9,18	5,9 ± 2,53
ADR	Eutanásia 1	18,57 ± 4,88	6,54 ± 2,17	59,10 ± 18,09 [a,b]
	Eutanásia 2	6,54 ± 2,17	14,66 ± 14,45	11,15 ± 5,48

Legenda: Concentração catecolaminas no plasma das aves. NOR= noradrenalina. ADR= adrenalina. a= diferente em relação ao grupo controle com $p< 0,05$; b= diferente em relação ao grupo salina com $p< 0,05$ (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).

A Figura 8 representa graficamente os resultados apresentados na tabela 8. Observa-se um aumento estatisticamente significante na concentração de adrenalina circulante nos animais que receberam LPS em comparação com os animais dos outros dois grupos, 3 horas após a administração das soluções ($F_{2,15}$=22.54; $p<0,05$).

Figura 8: Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina ou nos níveis plasmáticos de catecolaminas em frangos de corte



Legenda: Concentração de noradrenalina e adrenalina circulantes nas aves. a= diferente em relação ao grupo controle com p< 0,05; b= diferente em relação ao grupo salina com p< 0,05 (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).

Experimento 4: Quantificação da Corticosterona Sérica

Os dados obtidos foram paramétricos. A Tabela 9 mostra as médias e desvios padrão das concentrações de corticosterona no sangue periférico das aves. Os dados são apresentados em ng/ml de sangue.

Tabela 9: Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina nos níveis séricos de corticosterona em frangos de corte

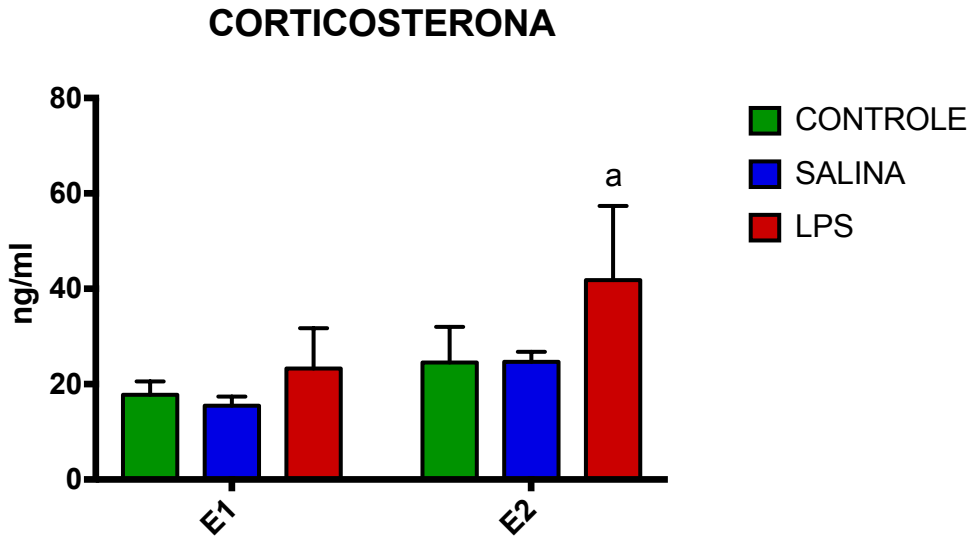
	CONTROLE	SALINA	LPS
Eutanásia 1	17,76±2,81	15,48±1,90	23,27±8,44
Eutanásia 2	24,56±7,47	24,66± 2,12	41,81±15,55[a]

Legenda: Concentração corticosterona no sangue das aves. a= diferente em relação ao grupo controle com p< 0,05; (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).

A Figura 9 representa graficamente os resultados apresentados na tabela 9. Observa-se um aumento estatisticamente significante na concentração de corticosterona circulante nos animais que receberam LPS em comparação com os

animais dos outros dois grupos decorridas 24 horas da administração ($F_{2,15}$= 0,98; p<0,05).

Figura 9: Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina nos níveis plasmáticos de corticosterona em frangos de corte.



Legenda: Concentração de corticosterona sérica nas aves. a= diferente em relação ao grupo controle e salinacom p< 0,05 (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).

Experimento 5: Determinação da relação heterófilos: linfócitos circulantes (H/L).

Os dados obtidos foram paramétricos. Os valores das médias e dos desvios padrão obtidos a partir do cálculo da relação entre o número de heterófilos e o número de linfócitos no sangue periférico das aves dos diferentes grupos são apresentados na Tabela 10.

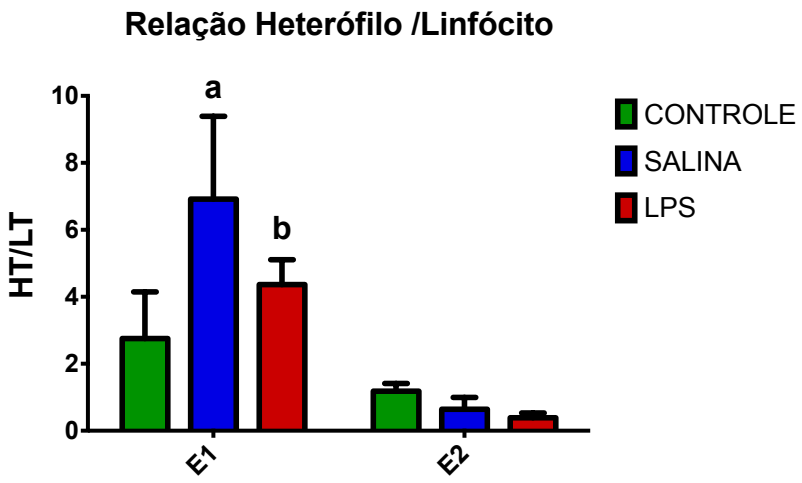
Tabela 10: Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina na relação heterófilo/linfócito no sangue periférico das aves

		CONTROLE	SALINA	LPS
HT/LT	Eutanásia 1	2,75 ± 1,39	6,19 ± 2,47 [a]	4,36 ± 0,74 [b]
	Eutanásia 2	1,18 ± 0,22	0,64 ± 0,35	0,79 ± 0,14

Legenda: Relação heterófilos / linfócitos no sangue periférico de frangos de corte. a= diferente em relação ao grupo controle com p< 0,05; b= diferente em relação ao grupo salina com p< 0,05 (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).

A Figura 10 representa graficamente os resultados apresentados na tabela 10. Observa-se um aumento significante na relação entre os heterófilos/linfócitos no sangue periférico dos animais que receberam solução salina em relação aos animais dos outros dois grupos, 3 horas após a administração ($F_{2, 15} = 8,86$; $p<0,05$). Embora se tenha observado um aumento desta relação nos animais do grupo LPS, este aumento não foi significante.

Figura 10: Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina na relação heterófilo/linfócito no sangue periférico das aves.



Legenda: Relação heterófilos / linfócitos no sangue periférico de frangos de corte. a= diferente em relação ao grupo controle com p< 0,05; b= diferente em relação ao grupo salina com p< 0,05 (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).

É interessante notar também que houve uma marcante diminuição desta relação nas aves de todos os grupos no segundo dia de eutanásia e, em especial naquelas dos grupos NaCl 0,9% e LPS, o que decorreu, muito provavelmente, em decorrência de uma redução geral da contagem de leucócitos no sangue periférico das aves 24 horas após a administração das soluções.

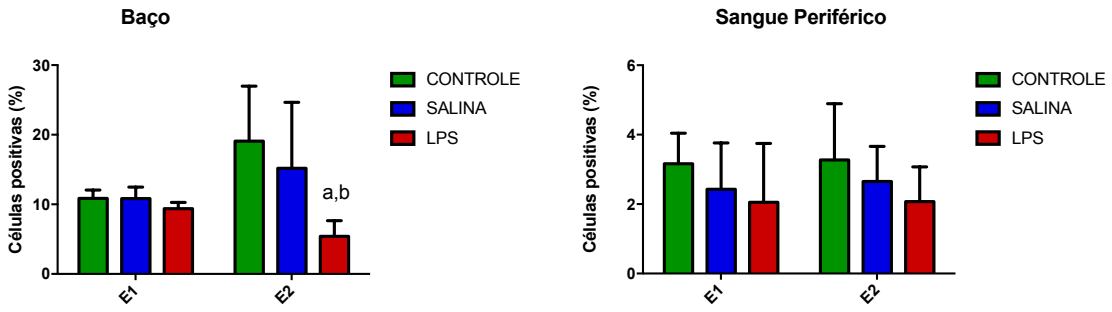
Experimento 6: Imunofenotipagem de leucócitos circulantes e esplênicos

As figuras 11 a 15 apresentam as porcentagens de células marcadas positivamente para o marcador específico da superfície de leucócitos, o receptor CD45. Após a identificação desta marcação inicial, foram selecionadas subpopulações especificas de leucócitos que foram concomitantemente positivos para outros marcadores de superfície específicos para cada tipo celular de interesse, tanto para os leucócitos circulantes no sangue periférico, quanto para aqueles que se encontravam no baço das aves no momento das eutanásias.

A figura 11 mostra que decorridas 24 horas da administração das soluções, observou-se uma redução estatisticamente significante na porcentagem de linfócitos B esplênicos nas aves tratadas com LPS em comparação com aquelas dos grupos controle e salina ($F_{2,\ 15} = 2,79; p<0,05$); entretanto esta redução não se traduziu diretamente por aumento da porcentagem destas células no sangue periférico dos animais.

Figura 11: Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina na porcentagem de linfócitos em frangos de corte.

Bu-1

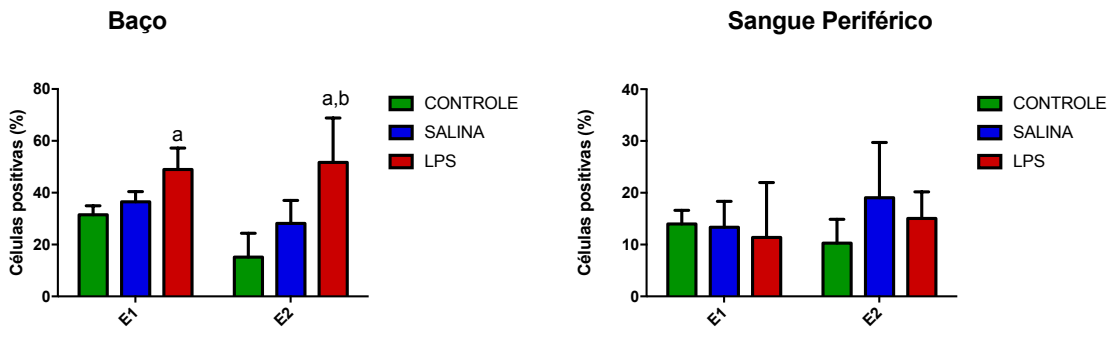


Legenda: Porcentagem de células positivas para o marcador de linfócitos B (Bu-1). a= diferente em relação ao grupo controle com p< 0,05; b= diferente em relação ao grupo salina com p< 0,05 (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).

Para avaliação dos linfócitos T, foram utilizados os marcadores: CD4 (característico dos linfócitos T_{helper}); e CD8 (característico dos linfócitos T $_{citotóxicos}$). A população de linfócitos T duplamente positiva está representada na Figura 12.

Figura 12: Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina na porcentagem de linfócito T duplamente positivos em frangos de corte

CD4+/ CD8+



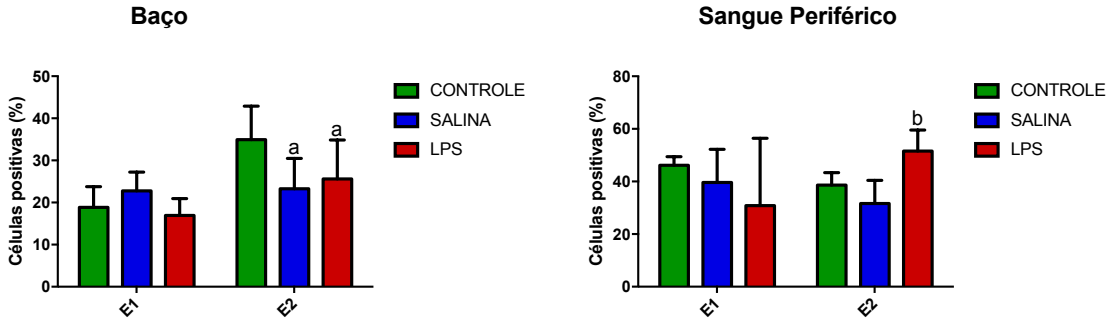
Legenda: Porcentagem de células positivas para os marcadores de linfócitos TCD4 e TCD8:a= diferente em relação ao grupo controle com p< 0,05; b= diferente em relação ao grupo salina com p< 0,05 (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).

No baço das aves a porcentagem de células T marcadas positivamente para os dois marcadores aumentou significantemente nos animais que receberam LPS, tanto 3 quanto 24 horas após a exposição ($F_{2, 15} = 2,36$; $p<0,05$). No primeiro momento, esta diferença foi observada apenas em relação aos animais do grupo controle; no entanto, 24 horas após a administração das soluções, observou-se também um aumento desta população em relação às aves do grupo salina.

Quando avaliamos a população de linfócitos T_{helper} ($CD4^+/CD8^-$), representada na Figura 13, observamos que decorridas 24 horas da manipulação das aves observa-se uma redução significante da porcentagem destas células no baço dos animais dos grupos salina e LPS em relação às aves do grupo controle ($F_{2, 15} = 3,41$; $p<0,05$). No mesmo momento observamos um aumento destas células no sangue periférico apenas nas aves que foram expostas à endotoxina, isto é, do grupo LPS.

Figura 13: Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina na porcentagem de linfócito T CD4 positivos em frangos de corte

CD4+ / CD8-

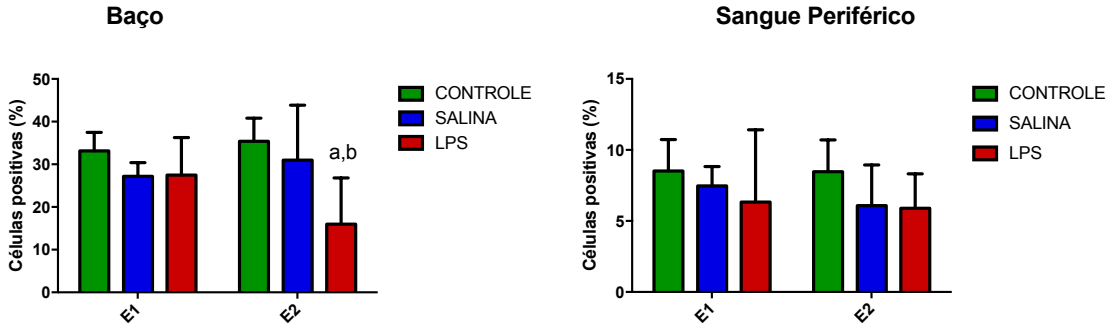


Legenda: Porcentagem de células positivas para o marcador de linfócitos TCD4. a= diferente em relação ao grupo controle com p< 0,05; b= diferente em relação ao grupo salina com p< 0,05 (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).

Como ilustrado pela figura 14, ao avaliarmos a população dos linfócitos T citotóxicos ($CD4^-/CD8^+$), observamos uma redução significante desta população no baço das aves que receberam LPS em comparação àquelas dos grupos controle e salina ($F_{2, 15} = 2,62$, $p<0,005$). Entretanto essa redução não se traduziu em aumento da porcentagem destas células no sangue periférico das aves.

Figura 14: Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina na porcentagem de linfócito TCD8 em frangos de corte

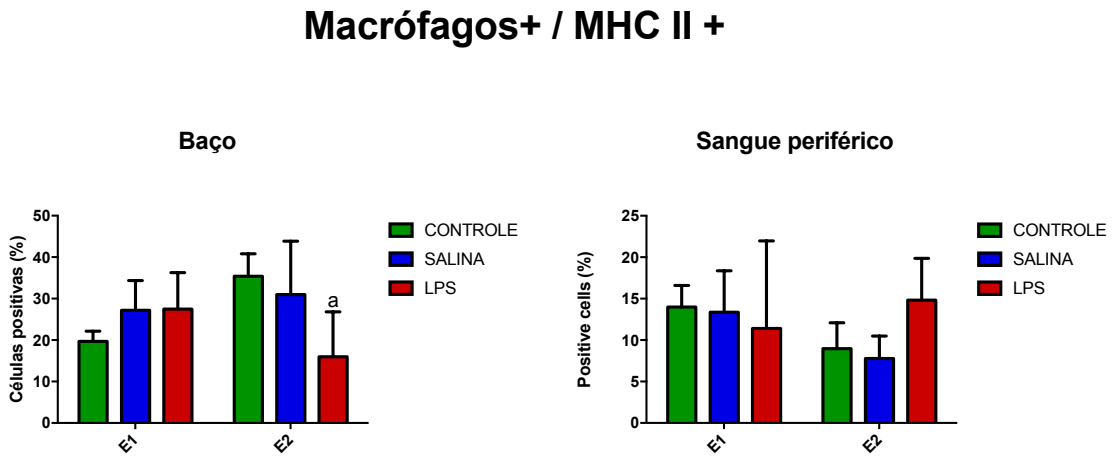
CD4-/CD8+



Legenda: Porcentagem de células positivas para o marcador de linfócitos TCD8. de frangos de corte. a= diferente em relação ao grupo controle com p< 0,05; b= diferente em relação ao grupo salina com p< 0,05 (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).

A figura 15 mostra o comportamento dos macrófagos após a administração de solução salina ou de LPS nas aves.

Figura 15: Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina na porcentagem de macrófagos em frangos de corte



Legenda: Porcentagem de células positivas para os marcadores de macrófagos e monócitos. a= diferente em relação ao grupo controle com p< 0,05; b= diferente em relação ao grupo salina com p< 0,05 (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida do teste de Bonferroni).

No momento da segunda eutanásia (E2) observou-se uma redução na porcentagem de macrófagos no baço das aves que receberam LPS em relação aos animais do grupo controle, e uma tendência de aumento destas células na circulação das aves que receberam LPS, em comparação àquelas do grupo controle ($F_{2, 15}$ = 6,6; p<0,05).

Experimento 7: Determinação do perfil de expressão de citocinas e de genes de ativação imediata no encéfalo das aves

O perfil de expressão de citocinas e dos genes de ativação imediata c-Fos e EGR1 no hipotálamo, na hipófise e na glândula adrenal das aves foi avaliado pela técnica de PCR em tempo real (qPCR), seguida pelo método de quantificação relativa delta-delta CT ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Inicialmente foi proposta a avaliação de 8 diferentes produtos nos 3 tecidos de interesse, entretanto em nenhum dos tecidos foi possível observar

quantidades detectáveis de IL-10 ou de INF-gamma, motivo pelo qual não serão apresentados dados referentes a expressão destas citocinas.

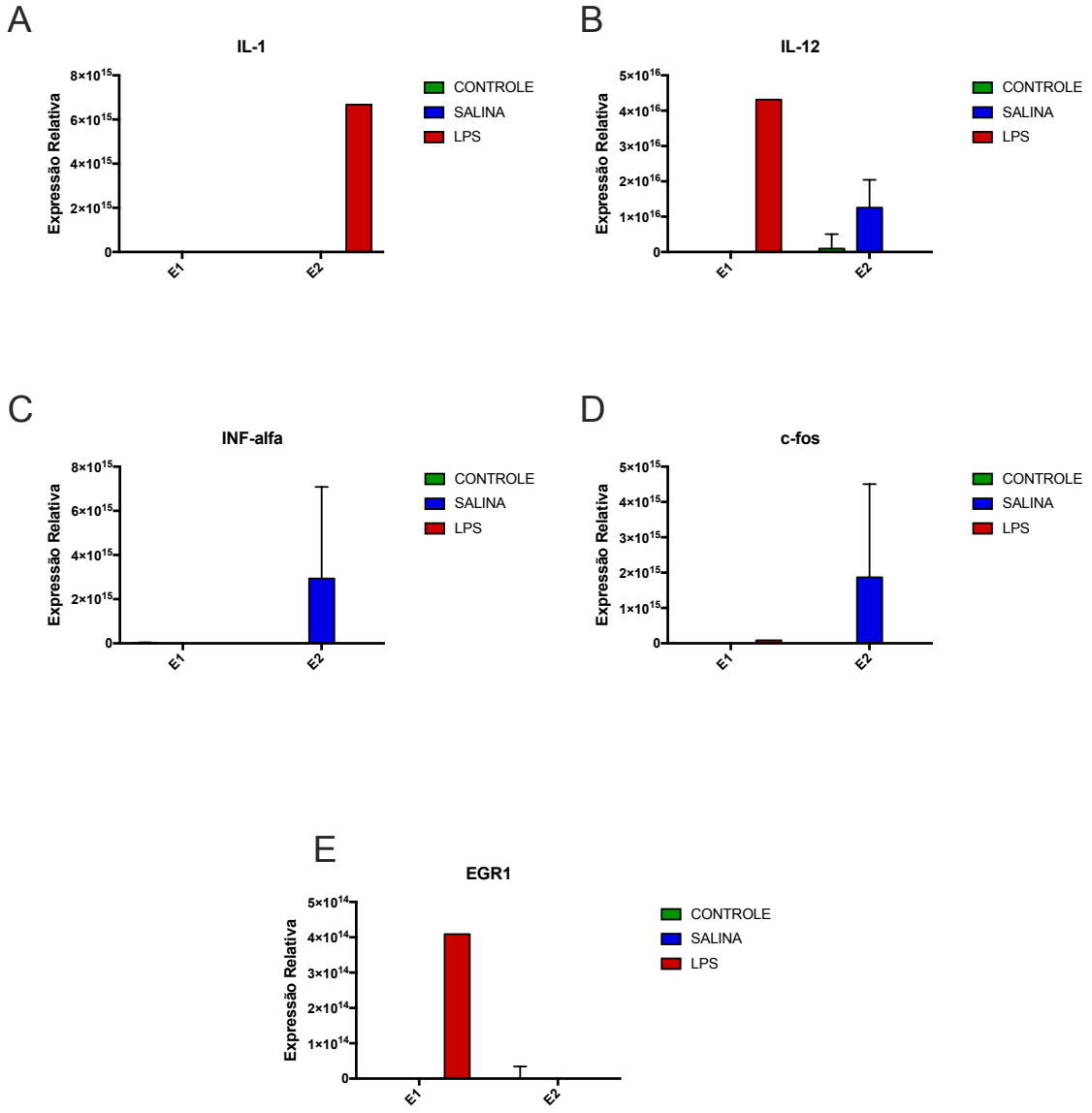
Nos três tecidos foram observados padrões diferentes de expressão de cada produto: no hipotálamo foi possível detectar a expressão de IL-1, IL-12, INF-alfa, c-Fos e EGR1. Na hipófise e na glândula adrenal detectamos IL-1, IL-2, INF-alfa e c-Fos. Entretanto, não foram observadas diferenças significantes na média da expressão de nenhum dos genes avaliados, em nenhum dos tecidos (ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey: $F_{(2,3)} = 1$; $p > 0,05$).

A figura 16 mostra a expressão relativa das citocinas IL-1, IL-12 e INF-alfa, e dos genes c-Fos e EGR-1 no hipotálamo das aves, decorridas 3 e 24 horas após a administração de solução salina ou LPS nas aves.

A expressão hipotalâmica de IL-1 (Figura 16 A) foi detectada apenas nos animais que receberam LPS, e apenas 24 horas após a administração das soluções (E2). Apesar da não ocorrência de diferenças significantes entre os grupos pode-se observar uma importante tendência de aumento da expressão de IL-1 no hipotálamo destas aves do grupo tratado com LPS em relação àquelas dos outros grupos neste momento (E2).

No momento da primeira eutanásia (E1), observamos uma tendência de aumento da expressão de IL-12 nos animais que receberam LPS, em comparação com aqueles dos demais grupos (Figura 16 B). De forma semelhante, a expressão de EGR1-1 (Figura 16 E) também parece ter sido maior nas aves que receberam LPS 3 horas após a exposição aos estímulos, não sendo mais detectada esta atividade em E2. O LPS não produziu alterações na expressão de INF-alfa e de c-Fos no hipotálamo.

Figura 16: Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina sobre a expressão gênica hipotalâmica das aves

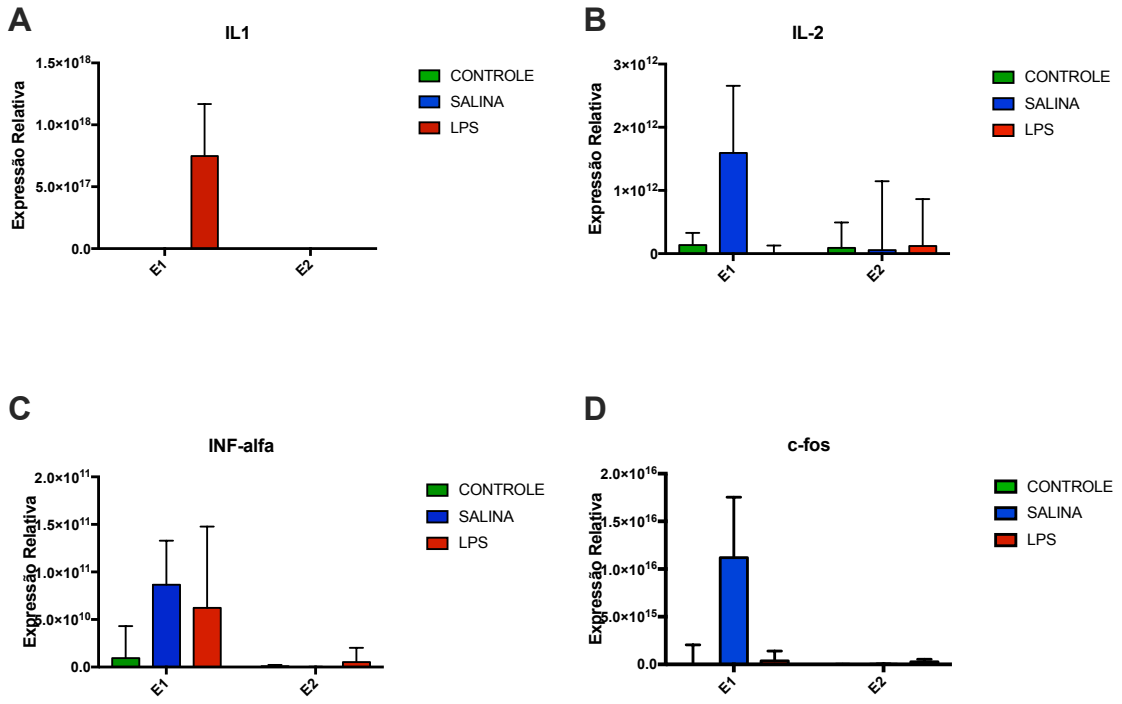


Legenda: Expressão relativa de citocinas e genes de ativação imediata no hipotálamo de frangos de corte.

A Figura 16 mostra, ainda, que administração da solução salina alterou a expressão gênica de INF-alfa (Figura 16 C) e de c-Fos (Figura 16 D), no momento da segunda eutanásia (E2).

A figura 17 apresenta graficamente a expressão relativa das citocinas IL-1, IL-2 e INF-alfa, e do gene c-Fos na hipófise das aves. Não foram detectados níveis significantes de expressão de IL-10, IL-12, INF-gamma ou de EGR1.

Figura 17: Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina na expressão gênica hipofisária das aves



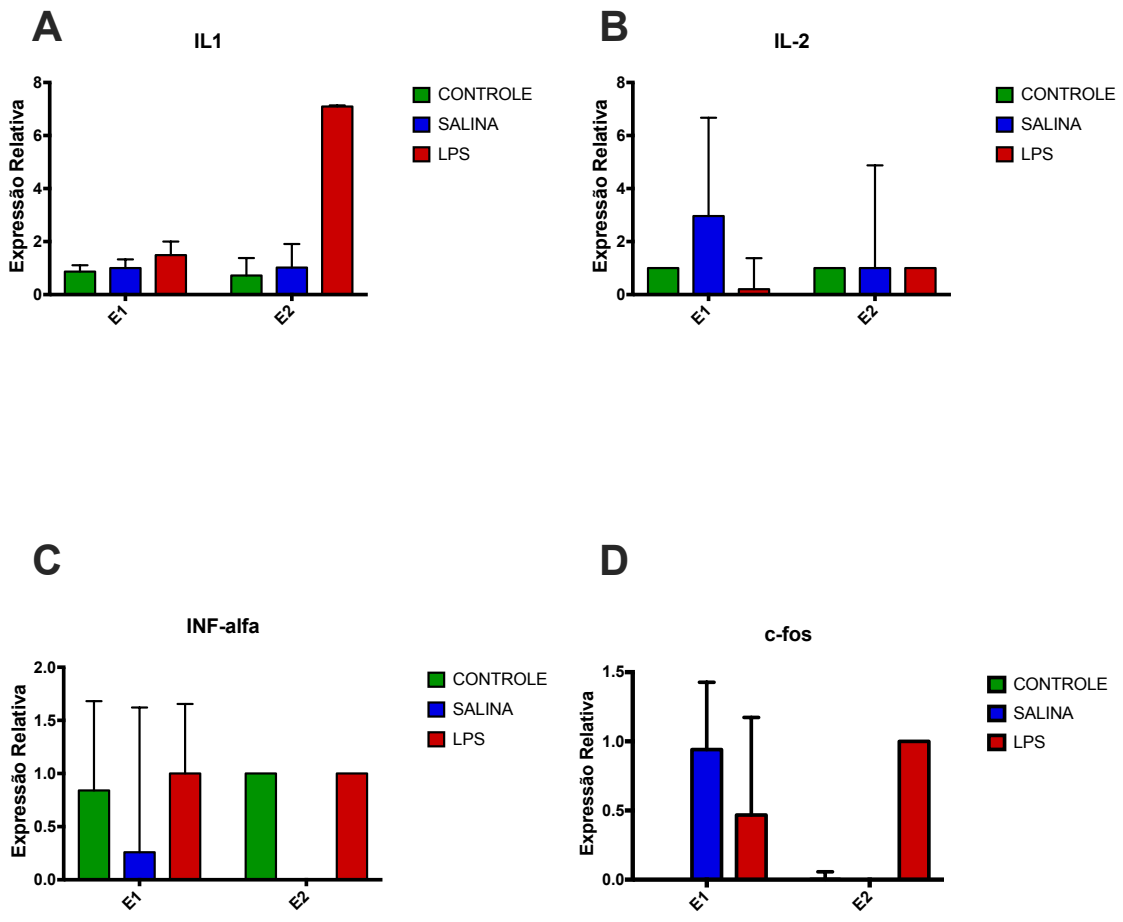
Legenda: Expressão relativa de citocinas e genes de ativação imediata na hipófise de frangos de corte.

Na hipófise observou-se uma tendência de aumento na expressão dos genes IL-1, IL-2, INF-alfa e do c-Fos apenas em E1. No entanto, não se observou expressão significativa dos genes avaliados em E2. Desta forma, a administração de LPS aumentou a expressão de IL-1, IL-2 e INF-alfa. Observa-se, ainda que a administração de solução salina produziu aumento na expressão de IL-2, INF-alfa e do gene c-Fos na hipófise das aves.

A figura 18 mostra a expressão relativa das citocinas IL-1, IL-2 e INF-alfa, e do gene c-Fos na glândula adrenal das aves, 3 e 24 horas após a administração de solução salina ou de LPS nas aves.

Observa-se que a administração de LPS produziu uma importante tendência de aumento da expressão de IL-1 em E2 na adrenal. A injeção da endotoxina aumentou, também, a expressão do gene c-Fos na adrenal das aves em comparação com aquelas do grupo controle, tanto em E1 quanto em E2. Saliente-se que não foi possível detectar a expressão destes produtos na adrenal as aves não manipuladas.

Figura 18: Efeitos da administração intravenosa de LPS ou de solução salina sobre a expressão gênica na glândula adrenal das aves



Legenda: Expressão relativa de citocinas e genes de ativação imediata na glândula adrenal de frangos de corte.

Observou-se, na adrenal, que a administração de solução salina produziu uma tendência de aumento, da expressão de IL-2 e de c-Fos em E1 em comparação às aves dos outros 2 grupos. O manejo das aves para administração de NaCl 0,9% promoveu, também, um importante aumento na expressão do c-Fos em relação às aves dos outros grupos, 3 horas após a manipulação (E1). A expressão de INF-alfa na adrenal foi muito semelhante entre as aves do grupo controle e do grupo LPS nos dois momentos avaliados.

5 DISCUSSÃO

A injeção sistêmica de LPS é uma ferramenta experimental que tem sido muito utilizada no estudo das relações bidirecionais entre os sistemas nervoso e imune, ou seja, em neuroimunomodulação (DUNN, 2009). De fato, o LPS estimula macrófagos residentes a produzir, entre outras moléculas IL-1 e TNF-α que, caindo na circulação, modificam a atividade do SNC. O modo pelo qual ocorre esta ação tem sido muito discutido; ocorreria por estimulação de aferências vagais (Figura 1), por travessar a barreira cérebro-sangue nos locais em que ela é permeável ou, ainda, por induzir modificações na expressão de interleucinas no SNC que, por sua vez, seriam responsáveis pelos efeitos finais (ALVES; PALERMO-NETO, 2007). De qualquer forma, as modificações centrais produzidas pela liberação de citocinas na periferia resultam na ativação de diversas regiões do SNC, incluindo-se aqui o hipotálamo e muito especialmente os núcleos hipotalâmicos responsáveis pelas atividades do SNS e do eixo HPA; modulam, assim, tanto a liberação hormonal como a de catecolaminas e as respostas comportamentais dos animais (DANTZER et al., 2008). Atuariam, portanto, da mesma forma que os estressores físicos como, por exemplo, contenção física, frio ou calor intensos, ruídos, natação forçada, medo condicionado, etc.

Muitos autores analisaram as alterações comportamentais, neuroquímicas, endócrinas ou imunes induzidas pelo LPS em animais de laboratório. Poucos o fizeram em aves. Menor ainda o número daqueles que analisaram os efeitos do LPS em aves dentro de uma perspectiva neuroimune, como proposto neste trabalho.

Os resultados do presente estudo mostram que a injeção de LPS em aves produziu alterações comportamentais importantes como, por exemplo: redução das frequências de alimentação, de locomoção, e de limpeza, ocorrências associadas a

um aumento concomitante da frequência de descanso. Estes dados em seu conjunto caracterizam a expressão do comportamento doentio em aves após exposição ao LPS em nosso modelo experimental.

Dados obtidos em animais de laboratório mostram que estressores físicos, agudos ou crônicos, produzem redução da ingestão de alimentos e/ou de água e perda de peso nos animais (PARÉ; GLAVIN, 1993). Mostram, ainda, redução da atividade exploratória (KENETH et al., 1986; WEISS et al., 1980). Fatos que confirmam a natureza estressora do LPS em aves.

É interessante notar que as aves do grupo SALINA, que passaram pelo mesmo estresse de manejo (contenção e injeção), mas não receberam o LPS, também apresentam alterações comportamentais importantes, como redução nas frequências de alimentação e de locomoção, e aumento na frequência de descanso. Estes achados são relevantes, pois mostram o efeito deletério de um estresse de manejo no comportamento das aves. Mostram, também, e reforçam a necessidade de inclusão de um grupo controle não manipulado em experimentos conduzidos com aves, em especial naquelas em que se pretende coletar amostras de sangue ou abater para coleta de tecidos.

Acredita-se que a expressão do comportamento doentio induzido pelo LPS em mamíferos não seja decorrente de uma depressão inespecífica do SNC uma vez que a redução dos comportamentos motores (de locomoção, exploração e de alimentação) foi atribuída a redução de motivação. Relatou-se que camundongas lactantes injetadas com LPS e expostas a temperatura ambiente baixa (6º C) recolhiam seus filhotes e reconstruíam seus ninhos em tempo menor que aquelas mantidas em temperatura agradável para a espécie (22º C) (AUBERT et al., 1997; COHN; DE SÁ-ROCHA, 2006).

Os presentes dados comportamentais obtidos em aves não permitem, de *per se,* que se faça idêntica inferência, embora os efeitos motores induzidos pelo LPS tenham vindo acompanhados por redução das frequências de parado e de descanso; ou seja, as aves podem ter apresentado outros comportamentos que não os registrados. No entanto, como não se mediram outros comportamentos, fica difícil extrair conclusões relativas a alterações motivacionais induzidas pelo LPS nos frangos. Mas, esta ocorrência não é de todo impossível; para comprová-la, seria necessário mostrar que a redução de atividade motora induzida pelo LPS é revertida pela exposição dos animais a situações motivacionais importantes como, por exemplo, a um jejum alimentar. Futuros experimentos poderão comprovar esta hipótese.

De qualquer forma, os achados comportamentais deste trabalho após administração do LPS em frangos de corte têm grande relevância em avicultura por demonstrar redução da frequência de alimentação na vigência de um modelo experimental de infecção, confirmando observações de ordem prática decorrentes do manejo de frangos de corte; embora não se tenha quantificado o consumo de ração neste trabalho, infere-se que uma redução da frequência de alimentação implique em redução do consumo e consequente aumento da conversão alimentar.

O hipotálamo é a região do SNC responsável pelo controle regulatório dos sistemas homeostáticos essenciais para a sobrevivência do organismo. Por meio de suas conexões sinápticas com diversas outras regiões do SNC o hipotálamo é parte importante do sistema límbico controlando tanto a liberação hormonal pela hipófise como a atividade do SNA (GOEHLER et al., 2000; DUKES, 2006).

Em mamíferos, a ativação do eixo HHA pela administração de LPS provoca alterações neuroquímicas importantes no SNC, resultando em aumento nos níveis de

noradrenalina, dopamina e de serotonina no hipotálamo 2 horas após sua administração (KABIERSCH et al., 1988; ZALCMAN et al., 1994; DUNN; SWIERGIEL; DE BEAUREPAIRE, 2005). De maneira muito semelhante, observamos em nosso modelo experimental com frangos de corte, um aumento no “turnover” de dopamina nos animais expostos ao LPS, em especial no momento E2 (24 horas após o LPS). Observamos, ainda, um aumento nos níveis e no “turnover” de serotonina nos animais que receberam tanto LPS quanto solução salina três horas após a administração das soluções. Ainda, observamos um aumento das concentrações de MHPG 24 horas pós a administração de LPS e uma redução do “turnover” de noradrenalina 3 horas após o tratamento, indicando estes dados um aumento da utilização de noradrenalina.

Embora a análise de neurotransmissores no hipotálamo não possa ser diretamente relacionada com a atividade locomotora, restrita muito mais a alterações na atividade de neurônios dopaminérgicos da substância nigra (BERNARDI et al., 1981; FRUSSA-FILHO E PALERMO-NETO, 1988), o aumento de “turnover” de dopamina presentemente relatado aponta fortemente nesta direção.

Neste sentido, a dopamina desempenha papel de relevância na elaboração da resposta de animais de laboratório aos estressores físicos (HERMAN et al., 1982;ROTH et al., 1988). Tem sido sugerido que estressores ativam neurônios das áreas mesolímbica e mesocortical destes animais (CARLSON et al., 1987; ABERCROMBIE et al., 1989) e, ainda, que o sistema dopaminérgico mesolímbico seja essencial para o aparecimento das respostas orgânicas aos estressores (RAY; HENKE; SULLIVAN, 1988). Em seu conjunto, estes dados sugerem que a dopamina seja um neurotransmissor necessário para a proteção dos organismos de mamíferos aos efeitos deletérios dos estressores (PARÉ; GLAVIN, 1993). Os presentes

resultados obtidos em aves apontam para a mesma direção após a administração do LPS, ou seja, na vigência de um estressor infeccioso em aves.

Como comentado, o aumento das concentrações de MHPG no hipotálamo das aves observado 24 horas após a administração do LPS sugere ocorrência de aumento da atividade em neurônios noradrenérgicos; neste caso, esta ocorrência não teria sido compensada, pelo menos neste momento, por aumento do “turnover” de noradrenalina. No entanto, este achado parece também refletir as decorrências do estresse induzido pelo LPS (estressor infeccioso) uma vez que inúmeros relatos mostraram aumento de atividade de neurônios noradrenérgicos hipotalâmicos em ratos e camundongos na vigência de estressores físicos ou psicológicos (ALVES; PALERMO-NETO, 2007; HANKE et al., 2012). É possível que a resposta do sistema noradrenérgico hipotalâmico aos estressores seja mais lenta em aves. De qualquer forma, também não observamos alterações do turnover de noradrenalina no hipotálamo dos animais do grupo salina 3 e 24 horas após o estresse físico de contenção do manejo.

Neste contexto, assim como discutido para a dopamina, a maioria dos trabalhos encontrados na literatura aponta para a necessidade da integridade dos tratos noradrenérgicos centrais para uma resposta orgânica efetiva contra os estressores (GLAVIN et al., 1983a). Mostrou-se que a exposição a estressores físicos aumentou o “turnover” de noradrenalina em ratos, fato este verificado por meio da determinação das concentrações de MHPG (GLAVIN et al., 1983b). Em particular, observou-se que regiões límbicas que incluem o hipotálamo, a amígdala e o hipocampo evidenciaram um rápido aumento no “turnover” de noradrenalina no SNC de ratos após contenção física ou aplicação de choque elétrico nas patas (TANAKA et al., 1982; GLAVIN et al., 1983b).

Um dos efeitos mais dramáticos das alterações induzidas pelos estressores físicos nos sistemas noradrenérgicos de animais de laboratório é a redução das atividades motora e exploratória, fato que vem acompanhados por desmotivação e redução na ingestão de alimentos (ANISMAN; ZACHARKO, 1982). Destaque-se que estes achados têm sido muito explorados por aqueles que estudam o papel dos estressores na depressão endógena como, por exemplo, por Anisman (ANISMAN; ZACHARKO, 1982).

Juntando-se as alterações discutidas acima, nos parece factível afirmar que os sistemas catecolaminérgicos centrais desempenhem importante papel na susceptibilidade ou resistência de aves aos efeitos do LPS.

Embora menos explorada que os outros neurotransmissores, também a serotonina foi objeto de estudo em animais de laboratório estressados. Mostrou-se, em particular, que estressores físicos de diferentes naturezas produziram aumento do “turnover” de serotonina no SNC (DUNN; ELFVIN; BERRIDGE, 1986;PARÉ; GLAVIN, 1993). Os presentes resultados obtidos 3 horas (E1) após administração do LPS em aves apontam na mesma direção.

Calefi e seus colaboradores observaram em nossos laboratórios que aves estressadas por calor e submetidas concomitantemente a um desafio infeccioso apresentaram aumento nas concentrações hipotalâmicas dos metabólitos MHPG e HVA, e no “turnover” de serotonina e de dopamina. Nos presentes experimentos, observamos resultados muito semelhantes, de forma que a injeção sistêmica de LPS também promoveu aumento no “turnover” de dopamina e de serotonina no hipotálamo das aves, mostrando que, de fato, a resposta desencadeada por agentes infecciosos em aves ocorre de maneira análoga ao que se observa em mamíferos após aplicação de estressores físicos (TURNBULL; RIVIER, 1995; CALEFI et al., 2019). Saliente-se

que os presentes resultados também mostram aumento do turnover de serotonina após o estresse de manejo + injeção (grupo salina).

De relevância, os presentes achados concordam também com dados provenientes de experimentos que mostraram ser a expressão do comportamento doentio, tanto em mamíferos quanto em frangos de corte de ocorrência simultânea ao aumento das concentrações de serotonina no hipotálamo (JOHNSON et al., 1993; DANTZER et al., 2007; CALEFI et al., 2016a)

De forma interessante e como já apontado para os dados comportamentais, nossos resultados mostram algumas alterações neuroquímicas nas aves que receberam NaCl 0,9% indicando esse fato e, mais uma vez, que a manipulação das aves para tratamento e coleta de sangue e/ou de tecidos é estressora de *per se*. Este fato evidencia a importância da adoção de técnicas de manejo adequadas na avicultura industrial, de modo a promover o bem-estar das aves e se evitarem perdas econômicas relacionadas a ativação do eixo HHA (ABPA, 2016b).

Alterações de atividade nervosa em vias monoaminérgicas centrais resultam na ativação do SNAS e do eixo HHA e, consequentemente, das concentrações de catecolaminas e de corticosterona circulantes nos animais (BESEDOVSKY; SORKIN, 1977; PALKOVITS. M, 1981; KARROW, 2006). Em concordância com estes dados, observamos em nossos experimentos que as aves do grupo “LPS” apresentaram maiores concentrações sanguíneas tanto de adrenalina (3 horas após a administração) como de corticosterona (24 horas após a administração), em comparação com as aves dos outros grupos.

Sabe-se ser a resposta do SNAS aos estressores mais rápida que aquela do eixo HHA pois depende de fenômenos elétricos decorrentes da ativação de fibras sensoriais aferentes do nervo vago e da liberação de neurotransmissores no núcleo

do trato solitário e do *locus coeruleus* da medula oblonga. A ativação destes núcleos resulta em uma cadeia de eventos neuronais que culminam na estimulação de vias simpáticas direcionadas à medula da adrenal que, por sua vez, libera adrenalina na circulação. Já a resposta do eixo HHA ao LPS demora algumas horas para ser detectada após o inicio da resposta inflamatória. Ela depende da regulação da expressão dos fatores de liberação hormonal hipotalâmicos e da liberação do ACTH pela hipófise; somente após estes eventos ela se manifesta por meio da liberação dos glicocorticoides pela glândula adrenal (VANDENBORNE et al., 2005; KARROW, 2006).

Dados relativos às concentrações plasmáticas de noradrenalina medidas em idênticos momentos nas aves tratadas com LPS concordam com os resultados neuroquímicos de noradrenalina no hipotálamo: observamos uma tendência de redução na concentração de noradrenalina circulante nos animais que receberam LPS 24 horas após o estimulo, indicando, à exemplo do que ocorreu no hipotálamo, maior uso desta monoamina sem concomitante aumento de sua síntese. Entretanto, há que ressaltar que a quantidade de noradrenalina liberada pela adrenal é bem menor que aquela de adrenalina e, também que a noradrenalina liberada pelos terminais nervosos do SNAS é rapidamente metaboliza nas sinapses. De qualquer forma, o aumento da liberação de catecolaminas pela adrenal reforça a presença de estresse infeccioso induzido pelo LPS em aves.

A medida dos níveis séricos de corticosterona e plasmáticos de adrenalina tem sido usada para avaliar o nível de estresse nos animais de produção. Neste contexto, a mensuração dos níveis de estresse em aves é de grande interesse, pois estes animais são frequentemente expostos a estressores físicos ou infecciosos que

reduzem a produtividade e, consequentemente, levam a importantes perdas econômicas (QUINTEIRO-FILHO et al., 2012b; CALEFI et al., 2016a).

Curiosamente e de forma inesperada frente aos dados discutidos anteriormente, o estresse físico de contenção para injeção de NaCl 0,9%, coleta de sangue e eutanásia não modificou as concentrações plasmáticas de adrenalina, de noradrenalina ou de corticosterona dos frangos (grupo salina), em relação aos animais do grupo naíve. Não temos, no momento, explicação plausível para este fato, mormente se comparado aos dados discutidos anteriormente nos animais do grupo NaCl 0,9%.

O aumento da corticosterona circulante tem efeitos imunes importantes. Em especial, aumenta a migração de leucócitos do baço e da medula óssea para a circulação e daí, aos órgãos periféricos provocando leucocitose e um aumento na resposta imune celular. Observa-se maior proporção de linfócitos $CD4^+$ em relação aos linfócitos $CD8^+$ e migração destas células para os sítios de lesão ativa, tanto em mamíferos como em aves (HILL, 1965; KARROW, 2006; ALVES; PALERMO-NETO, 2007; CALEFI et al., 2012).

Em aves, relatou-se um aumento na relação heterófilos/linfócitos em situações de estresse, devido à capacidade que tem a corticosterona de promover linfopenia, ao redistribuir os linfócitos do sangue para os tecidos linfoides (SHINI et al., 2008a). Entretanto, em nossos laboratórios Quinteiro-Filho não observou alterações importantes no leucograma de frangos de corte submetidos a um modelo de estresse térmico por calor (QUINTEIRO-FILHO, 2008).

A homeostase sanguínea é muito sensível e responde à presença de estressores ambientais ou infecciosos sendo, por isso mesmo, considerada como um importante indicador da presença de estresse em aves (SHINI et al., 2008b). Os

polimorfonucleares são os leucócitos que circulam em maior quantidade no sangue da maior parte das espécies de animais. Sabe-se que na presença de estressores ocorre um aumento no número destas células. Desta forma, uma proporção heterófilo/ linfócito (H:L) superior a 0,3 é, geralmente, indicativa do início de uma enfermidade infecciosa ou da ocorrência de estresse. Mais especificamente, a relação H:L é modificada em decorrência do aumento do número de heterófilos e da redução daquele de linfócitos (ROSA et al., 2011). Por este motivo, a relação H:L tem sido considerada um parâmetro eficiente para a mensuração do grau de bem-estar de aves, especialmente em aves de postura (MASHALY et al., 2004; QUINTEIRO-FILHO et al., 2010; KODAIRA, V;PEREIRA, .D. F; SOARES, 2015).

Resultados deste trabalho mostram que o estresse induzido pela manipulação das aves de *per se* produziu um aumento significante da relação H/L, reforçando, mais uma vez, a necessidade de introdução de um grupo *naíve* em experimentos com aves. De fato, e de forma muito interessante, a alteração da relação H/T foi mais evidente nas aves do grupo injetado com NaCl 0,9% que naquelas do grupo LPS. É possível que o estresse infeccioso produzido pelo LPS tenha ativado centros neurais que reduzem os efeitos de um estressor físico como a contenção das aves. Sabe-se que as respostas orgânicas aos estressores dependem do tipo de estressor, da magnitude do estressor e de sua duração (KARROW, 2006; ALVES et al., 2010). De qualquer forma, a relação H:L caracterizou o efeito estressor do manejo (contenção + injeção) a que foram submetidas as aves dos grupos salina e LPS deste trabalho.

Cabe ressaltar ainda, que a relação H/T das aves dos grupos LPS e NaCl 0,9% já haviam retornado a níveis próximos dos considerados “normais” ou fisiológicos 24 horas após as injeções, o que indica uma possível associação entre os níveis de

leucócitos circulantes e a rápida liberação de noradrenalina pelas terminações do SNAS e/ou de catecolaminas pelas glândulas adrenais.

A imunofenotipagem dos leucócitos é uma ferramenta interessante que permite avaliar, em maiores detalhes, a dinâmica das células imunes. Este método tem sido muito utilizado no campo da imunologia aviária e das relações entre patógenos e hospedeiros (BOHLS et al., 2006; BOEVER et al., 2010).

Em nossos laboratórios, Honda e seus colaboradores observaram os efeitos do estresse por calor sobre a eficiência da vacina contra a doença de Newcastle. Aves termicamente estressadas apresentaram redução dos linfócitos B circulantes e aumento dos linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$no sangue periférico, mas menor resposta vacinal. De maneira semelhante, Borsoi observou que o estresse por frio reduziu a proporção de linfócitos circulantes ao mesmo tempo em que aumentou a migração de *Salmonella Heiderberg* do intestino para a circulação (BORSOI et al., 2015; HONDA et al., 2015).

No presente experimento, observamos que o LPS também foi capaz de alterar as populações de leucócitos esplênicos e circulantes. De fato, observou-se uma redução na proporção de macrófagos no baço, e uma clara tendência de aumento desta proporção na circulação 24 horas após a exposição de aves ao LPS. Observamos, também neste momento, uma redução na proporção de linfócitos B, $T_{helpers}$ e $T_{citotóxicos}$ no baço; estes dados concordam com aqueles de Monjam e Collector em animais de laboratório. Estes autores observaram que níveis elevados de corticosteroides eram acompanhados por redução no número de células esplênicas viáveis em camundongos submetidos a um modelo de estresse agudo (MONJAN; COLLECTOR, 1977).

As aves que receberam LPS apresentaram, ainda, um aumento de células T duplamente marcadas no baço, o que pode ser apenas um reflexo da saída dos outros tipos celulares deste órgão.

Entretanto, o efeito do LPS na população de células circulantes mostrou-se estatisticamente significante apenas para os linfócitos $CD4^+$, que apresentaram aumento de proporção no sangue 24 horas após a exposição à endotoxina. A administração de NaCl 0,9% reduziu significantemente a porcentagem de células $CD4^+$ no baço das aves e não alterou estas células no sangue. Mais uma vez, depreende-se um efeito diferencial do estresse de manejo (físico) daquele de natureza infecciosa (LPS).

Portanto, quer nos parecer que o LPS tenha promovido o recrutamento de células imunes do baço, fato representado pela redução generalizada da porcentagem de leucócitos 24 horas após a administração das soluções. No sangue, observou-se apenas um aumento dos macrófagos e dos linfócitos $TCD4^+$ (T_{helper}) que estariam, muito provavelmente atuando na vigilância e organização da resposta imune, frente ao desafio representado pela endotoxina.

De maneira semelhante, o tratamento de aves com glicocorticoides reduziu as populações de linfócitos esplênicos B, $TCD8^+$ e a produção de imunoglobulinas IgM em aves tratadas com glicocorticoides, em comparação com aves do grupo controle (ISOBE; LILLEHOJ, 1992; VANDENBORNE et al., 2005). Este efeito foi semelhante àquele observado em mamíferos, nos quais tanto o estresse agudo, quanto a administração de glicocorticoides inibiram a proliferação *in vitro* de linfócitos T estimulados pela concavalina A (Con A) ou pela fitohemaglutinina (PE), prejudicando a produção de anticorpos, e suprimindo a produção de IL-2 (MONJAN; COLLECTOR, 1977; PRUETT; FISHER; DELOACH, 1987; ISOBE; LILLEHOJ, 1992).

Até o presente momento não foram encontrados na literatura estudos que tivessem avaliado a expressão de citocinas no SNC de aves utilizando a técnica de PCR em tempo real, apesar desta técnica ser amplamente utilizada para o estudo dos efeitos de estressores físicos e microbiológicos sobre a imunidade de aves em órgãos periféricos (ALVES et al., 2010; CALEFI, 2016b; QUINTEIRO-FILHO et al., 2017).

Como amplamente discutido neste trabalho, citocinas são proteínas mediadoras da resposta imune capazes de produzir importantes alterações nas respostas fisiológicas, neuroendócrinas e comportamentais por atuar no SNC, particularmente interferindo na expressão do comportamento doentio e na ativação do eixo HHA. São expressas em níveis basais, mas tem sua expressão bastante alterada em situações de injúria (STERNBERG, 1997).

Modelos experimentais com animais de laboratório que se valem da administração periférica de LPS mostraram que a expressão de citocina pró-inflamatórias como IL-1, a IL-2, IL-10, IL-12 e dos interferons alfa e gama no SNC são induzidas por injúria tecidual e estresse; mostraram, ainda, que esta expressão é influenciada pelas concentrações de glicocorticoides e de catecolaminas circulantes (STEMBERG, 1997).

Mostrou-se que um aumento nas concentrações circulantes de corticosterona suprime a síntese e a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos, reduzindo a expressão de seus receptores e suprimindo a proliferação de células imunes (STERNBERG, 1997; KARROW, 2006). Como amplamente discutido, citocinas alteram a atividade do eixo HHA e o metabolismo de neurotransmissores como de serotonina e de dopamina (LYON et al., 2011).

Estudos conduzidos por Dunn e seus colaboradores mostraram que alterações nos níveis de monoaminas cerebrais e de seus metabólitos também são influenciados

pela expressão de citocinas (DUNN, 2006). De modo particular, aumentos importantes nas concentrações hipotalâmicas dopamina e de noradrenalina, foram observados após administração intraperitoneal de IL-1. Esta citocina também foi capaz de aumentar o turnover de noradrenalina no hipotálamo e no hipocampo de ratos, além de aumentar o “consumo” de dopamina no córtex pré-frontal destes animais (ZALCMAN et al., 1994). Mais recentemente, a ativação do gene c-Fos no hipotálamo, também foi associada alterações na expressão de citocinas pró-inflamatórias (GOEHLER et al., 2000).

De maneira semelhante, mostrou-se que citocinas pró-inflamatórias provenientes da periferia como IL-1, IL-6 e TNF- α modulam a atividade de vias noradrenérgicas e serotoninérgicas no SNC de animais de laboratório, ativando o eixo HAA e aumentando a liberação de ACTH (TURNBULL; RIVIER, 1995).

Classicamente a IL-1 é descrita como a principal citocina responsável pelo inicio da resposta de fase a aguda a um agente infeccioso. Em especial, ela tem sido relatada como sendo a principal citocina induzida após administração periférica de LPS, respondendo pela ativação do eixo HHA. O aumento na expressão de IL-1 no SNC foi associado ao aumento das concentrações de ACTH e de corticosterona no plasma de animais de laboratório, resposta esta dependente da ativação do NPV do hipotálamo (TURNBULL; RIVIER, 1995; STERNBERG, 1997). De maneira semelhante observamos, em nosso trabalho, que as aves expostas ao LPS apresentaram maior expressão de IL-1 na hipófise e no hipotálamo, maior concentração de adrenalina circulante e aumento na concentração de corticosterona circulante.

Destaque-se ser muito importante o momento em que cada um destes parâmetros foi observado após a administração do LPS, pois as repostas orgânicas

induzidas por este estressor infeccioso são muito dinâmicas. Talvez por isso, observaram-se, neste trabalho, diferentes respostas ao LPS em cada um dos momentos de eutanásia. Nos animais que receberam LPS observamos em E1 (3 horas após o estímulo) um aumento da expressão de IL-1 na hipófise, o que coincidiu com o aumento observado na concentração de adrenalina circulante sugerindo estes achados, que os efeitos observados neste primeiro momento tenham sido mediados por respostas do SNS. Entretanto, em E2 (24 horas após o estímulo), observamos aumento da IL-1 no hipotálamo e aumento concomitante da concentração de corticosterona circulante, sugerindo que neste momento tenha prevalecido os efeitos do LPS sobre a atividade do eixo HHA.

A IL-10 é uma citocina classicamente associada a regulação da atividade das células Th1, sendo classificada como “imunossupressora”, limitando a magnitude da resposta inflamatória; entretanto mais recentemente foi demonstrado que possui uma ação muito importante na ativação do eixo HHA produzida por estressores físicos em mamíferos, tendo um papel essencial na indução da febre após a administração de LPS (LEON et al., 1999). Estudos realizados por Stafano e seus colaboradores mostraram que a IL-10 estimula a síntese de CRF e, consequentemente, aumenta a liberação de ACTH (STEFANO et al., 1998). A expressão de IL-10 na glândula adrenal de mamíferos também foi relacionada ao estresse. Camundongos deficientes em IL-10 apresentaram níveis basais mais altos de glicocorticoides circulantes e produziram até 5 vezes mais corticosterona em situações de estresse, quando comparados a animais não estressados (SMITH et al., 1999).

Entretanto, apesar das fortes evidências da participação da IL-10 na ativação do eixo HHA em resposta aos estímulos estressores, não observamos, alterações na expressão desta citocina em nosso modelo experimental. Neste sentido, o estudo da

expressão e da atividade de citocinas é particularmente complicado, pois se tratam de moléculas com ação rápida e transiente, e que têm a pleiotropia e a redundância como importantes características funcionais.

O aumento atividade do gene c-Fos na glândula adrenal já foi relacionado a ativação do eixo HHA em casos de sepse em humanos severamente queimados (CHO et al., 2004). Este aumento também foi induzido pela adição de ACTH em cultura de células da zona fasciculada da adrenal de mamíferos, bovinos e murinos, sendo, portanto um gene indicativo de maior atividade glandular, de maneira semelhante ao que ocorre no SNC (PENHOAT et al., 1996; CHO et al., 2004). Desta forma, quer nos parecer seja possível sugerir que o aumento da expressão dos genes c-Fos (na adrenal e na hipófise) e de EGR-1 no hipotálamo das aves sejam indícios de aumento de atividade do eixo HHA, neste caso provocado tanto pela administração de LPS quanto pelo manejo das aves que receberam solução salina estéril. Ou seja, os estressores físico e infeccioso estariam atuando na mesma direção.

O manejo das aves para a administração de solução salina estéril também promoveu importantes alterações na expressão de citocinas. Mostramos uma tendência a uma maior expressão de INF-α e de c-Fos no hipotálamo das aves 24 horas após a exposição ao este estressor físico (contenção e manejo para injeção); este resultado pode ser entendido como um indício de maior atividade nesta região do sistema nervoso.

De maneira geral a avaliação da expressão gênica de citocinas no SNC e na glândula adrenal da aves foi semelhante àquela descrita em mamíferos; entretanto há que ressaltar que citocinas são parte de uma complexa rede de efeitos, que é dinâmica, pleiotrópica (uma vez que cada citocina têm múltiplos efeitos) e redundante, pois a ação de uma citocina pode também ocorrer pela presença de outras citocinas

(LYON et al., 2011). Estas características inerentes às citocinas associadas à ausência de dados de literatura sobre o padrão de expressão destas moléculas no SNC de aves requer que se tenha muito cuidado quando da interpretação de dados experimentais. Assim, quer nos parecer seja relevante expressar que os presentes achados em aves representam um importante registro da expressão de citocinas em tecidos que compõem o eixo HHA nos dois momentos de eutanásia das aves.

Em seu conjunto, os resultados deste trabalho mostram sob uma perspectiva neuroimune, os efeitos resultantes da ativação do eixo hipotálamo-adrenal por estímulos estressores físicos (contenção + Injeção de NaCl 0,9%) e infecciosos (representados pelo LPS) em frangos de corte. Estes efeitos potencialmente resultam em importantes prejuízos para a imunidade e para o bem-estar das aves. Assim, ao mostrar o relevante papel dos estressores na ativação do eixo HHA e do SNS na patogênese da imunossupressão associada a ele, mostramos também a importância da adoção de boas práticas de manejo, em especial do controle de infecções para um maior bem-estar na criação das aves e maior rendimento da indústria avícola.

6 CONCLUSÕES

Conclusões Específicas

A administração de LPS em frangos de corte produziu:

- Alterações comportamentais compatíveis com aquelas descritas como comportamento doentio, caracterizadas por redução de atividade locomotora, comportamento alimentar e ingestão hídrica e realização de auto-limpeza, aumentando concomitantemente o tempo de descanso e reduzindo o tempo de parado das aves.
- Aumento nas concentrações e no “turnover” de dopamina e de serotonina e diminuição da concentração de noradrenalina no hipotálamo;
- Aumento na concentração plasmática de adrenalina após 3 horas de sua administração e aumento subsequente na concentração sérica de corticosterona 24 após a mesma;
- Redução generalizada de células esplênicas e aumento dos macrófagos e linfócitos T_{helper} circulantes 24 horas após a administração;
- Aumento na expressão de IL-1 no hipotálamo, na hipófise e na adrenal e aumento de atividade nervosa representada pelo aumento da expressão de IEGs no hipotálamo e na glândula adrenal.

Por outro lado, o estresse de manejo dos frangos de corte (contenção e injeção de NaCl 0,9%) produziu:

- Redução nas frequências de alimentação e de locomoção e aumento da frequência de descanso;

- Aumento da concentração e o “turnover” de serotonina 3 horas após o estímulo estressor e aumento na concentração de noradrenalina, sem modificação do *turnover* desta monoamina;
- Aumento da relação heterofilo/ linfócito 3 horas após sua aplicação;
- Redução da população de T_{helper} no baço sem aumento de sua proporção no sangue.
- Tendência de aumento de c-Fos e INF-alfa no hipotálamo; de IL-2, c-Fos e INF-alfa na hipófise e de c-Fos também na adrenal das aves.

Conclusão Geral

Tomados em seu conjunto, os presentes resultados decorrentes da administração sistêmica de LPS em frangos de corte mostram ativação neural induzida pela endotoxina, com reflexos neuroquímicos, comportamentais, de atividade do SNAS e do eixo HHA e, consequentemente de imunidade, atuando, portanto, como um estímulo estressor de natureza infecciosa.

De forma relevante, os presentes achados experimentais obtidos após a administração de solução salina estéril mostram que o manejo das aves de *per se* é estressor, promovendo alterações neuroimunes importantes evidenciando, este fato, a necessidade de inclusão de grupos controles adequados em experimentos de conduzidos com frangos de corte. Ressaltam, ainda, a importância para a indústria avícola do manejo adequado das aves para evitar perdas associadas às ativações do SNS e do eixo HHA induzidas por estressores físicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERCROMBIE, E. D. et al. Differential Effect of Stress on In Vivo Dopamine Release in Striatum, Nucleus Accumbens, and Medial Frontal Cortex. **Journal of Neurochemistry**, v. 52, n. 5, p. 1655–1658, 1989.

ABPA. Relatório Anual. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf>. 2016a. Acesso em: 1 out. 2017.

ABPA. **Protocolo de bem-estar para frangos de corte**, 2016b.

ALVES, G. J. et al. Immune-Neuro-Endocrine Interactions : Facts and Hypotheses. **Poultry science**, v. 17, n. 1, p. 64–102, fev. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045108>.

ALVES, G. J.; PALERMO-NETO, J. Neuroimunomodulação : sobre o diálogo entre os sistemas nervoso e imune. v. 29, n. 55 11, p. 363–369, 2007.

ANISMAN, H.; ZACHARKO, R. M. Depression: The predisposing influence of stress. **Behavioral and Brain Sciences**, v. 5, n. 1, p. 89–99, 1982.

AUBERT, A. et al. Differential effects of lipopolysaccharide on pup retrieving and nest building in lactating mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 11, n. 2, p. 107–118, 1997.

AUBERT, A. Sickness and behaviour in animals: a motivational perspective. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 23, n. 7, p. 1029–36, nov. 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10580315>.

AWIN. **AWIN Welfare assessment protocol for Turkeys**.2015

BAERT, K. et al. Sodium salicylate attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced adipsia, but not hypophagia, in broiler chickens. **British poultry science**, v. 46, n. 2, p. 144–8, abr. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15957433>. Acesso em: 8 jul. 2013.

BASSO, A. S. et al. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. **Journal of Neuroimmunology**, v. 140, n. 1–2, p. 69–77, jul. 2003. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165572803001668>. Acesso em: 25 maio. 2013.

BERKENBOSCH, F. et al. Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. **Science (New York, N.Y.)**, v. 238, n. 4826, p. 524–6, 23 out. 1987. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2659278&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

BERNARDI M.M; SOUZA H; PALERMO-NETO J. Effects of single and long-term haloperidol administration on open-field behavior of rats. **Psychopharmacol.** 73: 171-

175, 1981.

BESEDOVSKY, H. et al. Immunoregulation Mediated by the Sympathetic Nervous System. **Cellular Immuniology**, v. 48, p. 346–355, 1979.

BESEDOVSKY, H. et al. Immunoregulatory Feedback Between Interleukin - 1 and Glucocorticoid Hormones. **Science**, v. 233, n. 1970, p. 652–654, 1986.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A. Immune-Neuro-Endocrine Interactions : Facts and Hypothesis. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 1, p. 64–102, 1996.

BESEDOVSKY, H. O.; SORKIN, E. Network of immune-neuroendocrine interactions. **Clin. exp. immunol**, v. 52, n. 10, p. 6810–6815, 1977.

BOEVER, S. De et al. Flow cytometric differentiation of avian leukocytes and analysis of their intracellular cytokine expression v. 9457, 2010.

BOHLS, R. L. et al. The use of flow cytometry to discriminate avian lymphocytes from contaminating thrombocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 30, n. 9, p. 843–850, 2006.

BORSOI, A. et al. Effects of cold stress and Salmonella Heidelberg infection on bacterial load and immunity of chickens. **Avian Pathology**, v. 44, n. 6, p. 490–497, 2015.

BREBNER, K. et al. Synergistic Effects of Interleukin-1 ℕ , Interleukin-6 , and Tumor Necrosis Factor : Central Monoamine , Corticosterone , and Behavioral Variations. n. 99, 1999.

BROOM, D.M.; MOLENTO, C. F. . BEM-ESTAR ANIMAL: CONCEITO E QUESTÕES RELACIONADAS. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, p. 1–11, 2004. Disponível em:<http://www.unb.br/posgraduacao/docs/fav/BEMESTARANIMALCONCEITOQUESTOESRELACIONADAS.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2015.

BUTLER, A. N. N. B.; COTTERILL, R. M. J. Mammalian and Avian Neuroanatomy and the. n. October, p. 106–127, 2006.

CAI, W. et al. Interferon-α-induced modulation of glucocorticoid and serotonin receptors as a mechanism of depression. **Journal of Hepatology**, v. 42, n. 6, p. 880–887, 2005.

CALEFI, A. S. et al. Effects of long-term heat stress in an experimental model of avian necrotic enteritis. **IMMUNOLOGY , HEALTH , AND DISEASE**, p. 1344–1353, 2012.

CALEFI, A. S. et al. Effects of long-term heat stress in an experimental model of avian necrotic enteritis. **Poult Sci**, v. 93, n. 6, p. 1344–1353, 2014. Disponível em:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24879684%5Cnhttp://ps.oxfordjournals.org/content/93/6/1344.full.pdf>.

CALEFI, A. S. **Avaliação dos efeitos do estresse por calor sobre a imunidade de**

frangos de corte em modelos experimentais de enterite necrótica aviária. 2016a. FMVZ USP, 2016a.

CALEFI, A. S. et al. The gut-brain axis interactions during heat stress and avian necrotic enteritis. **Poultry science**, v. 95, n. 5, p. 1005–1014, 2016b.

CALEFI, A. S. et al. Effects of heat stress on the formation of splenic germinal centres and immunoglobulins in broilers infected by Clostridium perfringens type A. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 171, p. 38–46, 2016c. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.02.004>.

CALEFI, A. S. **Avaliação dos efeitos do estresse por calor sobre a imunidade de frangos de corte em modelos experimentais de enterite necrótica aviária**. 2016. Universidade de São Paulo, 2016d.

CALEFI, A. S. et al. Neuroimmunomodulation and heat stress in poultry. **World's Poultry Science Journal**, v. 73, n. September 2017, p. 493–504, 2017.

CALEFI, A. S. et al. Heat Stress Modulates Brain Monoamines and Their Metabolites Production in Broiler Chickens Co-Infected with Clostridium perfringens Type A and Eimeria spp. **Veterinary Sciences**, n. 5, p. 1–14, 2019.

CAPURON, L.; DANTZER, R. Cytokines and depression: the need for a new paradigm. **Brain, behavior, and immunity**, v. 17 Suppl 1, p. S119-24, fev. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615197>.

CARLSON, J. N. et al. Selective enhancement of dopamine utilization in the rat prefrontal cortex by food deprivation. **Brain Research**, v. 400, n. 1, p. 200–203, 1987.

CÉSPEDES, I. C. Presença da proteína fos em regiões do sistema nervoso central de roedores submetidos ou não ao alprazolam após choque e restrição. 2007. Universidade de São Paulo, 2007.

CHENG, G. et al. Antibiotic alternatives: The substitution of antibiotics in animal husbandry? **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. MAY, p. 1–15, 2014.

CHO, K. et al. CD14- and toll-like receptor 4-dependent regulation of c-Fos, c-Jun and c-Jun phosphorylation in the adrenal gland after burn injury. **Pathobiology**, v. 71, n. 6, p. 302–307, 2004.

CHROUSOS, G. P. The Hypothalamic–Pituitary– Adrenal Axis And Immune-Mediated Inflammation. **Seminars In Medicine Of The Beth Israel Hospital**, v. 332, n. 20, p. 1351–1362, 1995.

COHN, D. W. H.; DE SÁ-ROCHA, L. C. Differential effects of lipopolysaccharide in the social behavior of dominant and submissive mice. **Physiology & behavior**, v. 87, n. 5, p. 932–7, 30 maio 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16580030>. Acesso em: 12 ago. 2012.

CONTI, P. et al. IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always.

Immunology Letters, v. 86, n. 2, p. 123–129, abr. 2003. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165247803000026>. Acesso em: 26 jul. 2012.

CRUZ-MACHADO, S. da S. Lipopolissacarídeo (lps): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição nfkb. **REVISTA DA BIOLOGIA**, v. 4, p. 40–43, 2010.

DA SILVA, A. V. **Estudo das projeções hipotalâmicas para a região urocortinérgica do complexo oculomotor**. 2010.

DAHIYA, J. P. et al. Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. **Animal Feed Science and Technology**, v. 129, n. 1–2, p. 60–88, ago. 2006. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377840105004311>. Acesso em: 18 jul. 2012.

DANTZER, R. et al. From Inflammation to Sickness and Depression: When the Immune System Subjugates the Brain. **Nature Reviews Neroscience**, v. 17, n. 1, p. 64–102, fev. 2007. Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1650/00105422(2000)102[0392:SCAHTL]2.0.CO;2>.

DANTZER, R.; WOLLMAN, E. E.; YIRMIYA, R. **Cytokines, stress, and depression**. 2008.

DEBUT, M. et al. Behavioural and Physiological Responses of Three Chicken Breeds to Pre-Slaughter Shackling and Acute Heat Stress. **Br Poult Sci**, v. 46, n. 5, p. 527–535, 2005.

DRAGUNOW, M. et al. Immediate-early gene protein expression in neurons undergoing delayed death, but not necrosis, following hypoxic-ischaemic injury to the young rat brain. **Brain research. Molecular brain research**, v. 25, n. 1–2, p. 19–33, ago. 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7984048>.

DUKES, H. H. **Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12a edição ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2006.

DUNN, A. J. et al. Virus Infection as a Stressor : Influenza Virus Elevates Plasma Concentrations of Corticosterone , and Brain Concentrations of M H P G and Tryptophan. **Physiology & Behavior**, v. 45, n. 15, p. 591–594, 1989.

DUNN, A. J. The Role of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor a in the Neurochemical and Neuroendocrine Responses to Endotoxin. **Brain Research Bullefin**, v. 29, p. 807–812, 1992.

DUNN, A. J. Cytokine Activation of the HPA Axis. **Annals New York Academy Of Sciences**, v. 1, p. 608–617, 1999.

DUNN, A. J. Effects of cytokines and infections on brain neurochemistry. **Clin**

Neurosci Res., v. 6, p. 52–68, 2006.

DUNN, A. J. Neurochemical and Endocrine Responses to Immune Activation : the Role of Cytokines. **The Neuroimmunological Basis of Behavior and Mental Disorders**, n. January, 2009.

DUNN, A. J.; ELFVIN, K. L.; BERRIDGE, C. W. Changes in plasma corticosterone and cerebral biogenic amines and their catabolites during training and testing of mice in passive avoidance behavior. **Behavioral and Neural Biology**, v. 46, n. 3, p. 410–423, 1986.

DUNN, A. J.; SWIERGIEL, A. H.; DE BEAUREPAIRE, R. Cytokines as mediators of depression: What can we learn from animal studies? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4–5, p. 891–909, 2005.

EL-LETHEY, H.; HUBER-EICHER, B.; JUNGI, T. W. Exploration of stress-induced immunosuppression in chickens reveals both stress-resistant and stress-susceptible antigen responses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 95, n. 3–4, p. 91–101, out. 2003.

FRUSSA-FILHO R; PALERMO-NETO J.. Effects of single and long-term metochlopramide administration on open-field and stereotyped behavior of rats. **Eur. J. Pharmacol.** 149: 323-329. 1988 .

GENTILINI, F. P.; ANCIUTI, M. A. **Tópicos atuais na produção de suínos e aves**. 2013.

GLAVIN, G. B. et al. Effects of Altered Brain Noradrenaline Level on Acute Stress in Rats. **The Kurume Medical Journal**, p. 31–34, 1983a.

GLAVIN, G. B. et al. Regional rat brain noradrenaline turnover in response to restraint stress. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 19, n. 2, p. 287–290, 1983b.

GOEHLER, L. E. et al. Vagal immune-to-brain communication: a visceral chemosensory pathway. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, n. 85, p. 49–59, 2000.

GOMES, A. V. S. et al. Overcrowding stress decreases macrophage activity and increases Salmonella Enteritidis invasion in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 43, n. 1, p. 82–90, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2013.874006>.

HANKE, M. L. et al. Beta adrenergic blockade decreases the immunomodulatory effects of social disruption stress. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 26, n. 7, p. 1150–1159, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2012.07.011>.

HART, B. L. Biological basis of the behavior of sick animals. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 12, n. 2, p. 123–37, jan. 1988. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3050629>.

HECKERT, R. A.; ESTEVEZ, I. Effects of Density and Perch Availability on the Immune Status of Broilers. 1998.

HERMAN, J. P. et al. Differential effects of inescapable footshocks and of stimuli previously paired with inescapable footshocks on dopamine turnover in cortical and limbic areas of the rat. **Life Sciences**, v. 30, n. 25, p. 2207–2214, 1982.

HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends in neurosciences**, v. 20, n. 2, p. 78–84, fev. 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9023876>.

HILL, J. A. Indicators of Stress in Poultry. n. 1952, p. 24–32, 1965.

HONDA, B. T. B. **Avaliação dos efeitos do estresse por calor sobre a atividade de linfócitos e a resposta vacinal ao paramixovírus (Doença de Newcastle) em frangos de corte**. 2013. Universidade de São Paulo, 2013.

HONDA, B. T. B. et al. Effects of heat stress on peripheral T and B lymphocyte profiles and IgG and IgM serum levels in broiler chickens vaccinated for Newcastle disease virus. **Poultry Science**, v. 94, n. 10, p. 2375–2381, 2015.

ISOBE, T.; LILLEHOJ, H. S. Effects of Corticosteroids on Lymphocyte Subpopulations and Lymphokine Secretion in Chickens. **Avian Diseases**, v. 36, n. 3, p. 590–596, 1992.

JARVIS, E. D. et al. Avian brains and a new understanding of vertebrate brain. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 2, p. 151–9, fev. 2005. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2507884&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

JOHNSON, R. W. et al. Sickness behavior in birds caused by peripheral or central injection of endotoxin. **Physiology & behavior**, v. 53, n. 2, p. 343–8, fev. 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8446696>.

KABIERSCH, A. et al. Interleukin-1 induces changes in norepinephrine metabolism in the rat brain. **Brain Behavior and Immunity**, v. 2, n. 3, p. 267–274, 1988.

KARROW, N. A. Activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and autonomic nervous system during inflammation and altered programming of the neuroendocrine–immune axis during fetal and neonatal development: Lessons learned from the model inXammagen, lipopolysacch. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 20, p. 144–158, 2006.

KNAPSKA, E.; KACZMAREK, L. A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK? **Progress in neurobiology**, v. 74, n. 4, p. 183–211, nov. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15556287>. Acesso em: 10 jul. 2014.

KENNETH G.A; CHAOULOFF F; MARCOU M; CURSON G.Female rats are more vulnerable than males in an animal model of depression: the possible role of serotonin.

Brain Res. 382: 416-421. 1986.

KORTE, S. M. et al. Plasma catecholamine and corticosterone levels during manual restraint in chicks from a high and low feather pecking line of laying hens. **Physiology and Behavior**, v. 62, n. 3, p. 437–441, 1997.

LARSON, S. J.; DUNN, a J. Behavioral effects of cytokines. **Brain, behavior, and immunity**, v. 15, n. 4, p. 371–87, dez. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11782104>. Acesso em: 22 jul. 2012.

LEON, L. R. et al. An antipyretic role for interleukin-10 in LPS fever in mice. **The American journal of physiology**, v. 276, n. 1 Pt 2, p. R81--9, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9887180>.

LIM, C. P.; JAIN, N.; CAO, X. Stress-induced immediate-early gene, egr-1, involves activation of p38/JNK1. **Oncogene**, v. 16, n. 22, p. 2915–2926, 1998.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the 2⋙⌬⌬CT Method. **METHODS**, v. 25, p. 402–408, fev. 2001.

LYON, D. et al. Challenges in interpreting cytokine biomarkers in biobehavioral research: A breast cancer exemplar. **Biological Research for Nursing**, v. 13, n. 1, p. 25–31, 2011.

MASHALY, M. M. et al. The role of neuroendocrine immune interactions in the initiation of humoral immunity in chickens. **Domestic animal endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 409–22, set. 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9785045>.

MASHALY, M. M. et al. Effect of Heat Stress on Production Parameters and Immune Responses of Commercial Laying Hens. **Poultry Science Association, Inc**, v. 83, n. 6, p. 889–894, 2004.

MCEWEN, B. S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain research**, v. 886, n. 1–2, p. 172–189, 15 dez. 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11119695>.

MENDES, C. M.; TADEU, F.; BORGES, D. M. Economia Economia (introdução). p. 158, 2007.

MILLAN, M. J. The neurobiology and control of anxious states. **Progress in Neurobiology**, v. 70, n. 2, p. 83–244, jun. 2003. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030100820300087X>. Acesso em: 23 jul. 2012.

MONJAN, A.; COLLECTOR, M. Stress-Induced Modulation of the Immune Response. **Science**, v. 2697, n. 196, p. 307–308, 1977.

PALKOVITS, M. Catecholamines in the Hypothalamus: An Anatomical Review. **Neuroendocrinilogy**, v. 33, p. 123–128, 1981.

PARÉ, W.P; GLAVIN G.B. Animal models of stress in pharmacology. In: F. van Haaren (Ed). **Methods in Behavioral Pharmacology**. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Holanda. Pp 413-441.1993.

PENHOAT, A. et al. Regulation of primary response and specific genes in adrenal cells by peptide hormones and growth factors. **Steroids**, v. 61, n. 4, p. 176–183, 1996.

PINTO, F. A. da C. **Correlatos neurais e comportamentais da asma alérgica experimental em camundongos**. 2004.

PRADO, P. T. C.; BEL, E. A. Del. c-fos, Um gene de ativação imediata como marcador neural de nocicepção. p. 424–433, 1998.

PRUETT, J. H.; FISHER, W. F.; DELOACH, J. R. Effects of dexamethasone on selected parameters of the bovine immune system. **Veterinary Research Communications**, v. 11, n. 4, p. 305–323, 1987.

QUALITY WELFARE. **The Overall On-farm Animal Welfare Score**.2009

QUINTEIRO-FILHO, W. M. **Efeitos do estresse térmico por calor sobre os indices zootécnicos, a integridade do trato intestinal e a imunidade inata em frangos de corte**. 2008.

QUINTEIRO-FILHO, W. M. et al. Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. **Poultry science**, v. 89, n. 9, p. 1905–14, set. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20709975>. Acesso em: 14 ago. 2012.

QUINTEIRO-FILHO, W. M. et al. Heat stress impairs performance and induces intestinal inflammation in broiler chickens infected with Salmonella Enteritidis. **Avian Pathology**, v. 41, n. 5, p. 421–427, 2012a.

QUINTEIRO-FILHO, W. M. et al. Acute Heat Stress Impairs Performance Parameters and Induces Mild Intestinal Enteritis in Broiler Chickens: Role of Acute HPA Axis Activation. **J Anim Sci**, 2012b.

QUINTEIRO-FILHO, W. M. **Efeitos do estresse por calor sobre a imunidade e a migração de Salmonela enteritidis em frangos de corte**. 2013. Universidade de São Paulo, 2013.

QUINTEIRO-FILHO, W. M. et al. Heat stress decreases expression of the cytokines, avian β-defensins 4 and 6 and Toll-like receptor 2 in broiler chickens infected with Salmonella Enteritidis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 186, p. 19–28, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.02.006>.

RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual review of biochemistry**, v. 71, p. 635–700, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045108>.

RAY, A.; HENKE, P. G.; SULLIVAN, R. M. Effects of intra-amygdalar dopamine agonists and antagonists on gastric stress lesions in rats. **Neuroscience Letters**, v. 84, n. 3, p. 302–306, 1988.

RIVEST, S. Molecular insights on the cerebral innate immune system. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 17, n. 1, p. 13–19, 2003.

ROSA, G. do Amaral da et al. Perfil hematológico de codornas japonesas (Coturnix japonica) sob estresse térmico. **Ciência Rural**, p. 1–6, 2011.

ROSSI-GEORGE, A. et al. Neuronal, endocrine, and anorexic responses to the T-cell superantigen staphylococcal enterotoxin A: dependence on tumor necrosis factor-alpha. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 22, p. 5314–22, 1 jun. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15930379>. Acesso em: 26 jul. 2012.

ROTH R; TAM S; Ida T; YANG J; DEUTCH A. Stress and mesocorticolimbic dopamine systems. **Ann, N,Y, Acad. Sci,** 537: 138-147. 1988.

SAWCHENKO, P. E. et al. The distribution and cells of origin of serotonergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. **Brain research**, v. 277, n. 2, p. 355–60, 31 out. 1983. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6357352>.

SELYE, H. The syndrome produced by diverse noxious agents. **Nature**, v. 138, p. 32–34, 1936.

SELYE, H. Stress and Disease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 122, n. 3171, 1955.

SERRATS, J. et al. Dual Roles for Perivascular Macrophages in Immune-to-Brain Signaling. **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 94–106, 2010.

SHERIDAN, J. The HPA axis, SNS, and immunity: a commentary. **Brain, behavior, and immunity**, v. 17 Suppl 1, p. S17, fev. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12688290>.

SHINI, S. et al. Differential alterations in ultrastructural morphology of chicken heterophils and lymphocytes induced by corticosterone and lipopolysaccharide. v. 122, p. 83–93, 2008a.

SHINI, S. et al. Biological response of chickens (Gallus gallus domesticus) induced by corticosterone and a bacterial endotoxin. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 149, n. 2, p. 324–33, mar. 2008b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18024213>. Acesso em: 30 jul. 2012.

SIEGEL, W. . B. .; GROSS, H. . S. Evaluation of the Heterophil / Lymphocyte Ratio as a Measure of Stress in Chickens. **Avian Diseases**, v. 27, n. 4, p. 972–979, 1983.

SLATTERY, D. a et al. Comparison of alterations in c-fos and Egr-1 (zif268) expression

throughout the rat brain following acute administration of different classes of antidepressant compounds. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 30, p. 1278–1287, 2005.

SMITH, E. M. et al. **IL-10 as a mediator in the HPA axis and brainJournal of Neuroimmunology**, 1999.

STEFANO, G. B. et al. Interleukin-10 stimulation of corticotrophin releasing factor median eminence in rats: Evidence for dependence upon nitric oxide production. **Neuroscience Letters**, v. 256, n. 3, p. 167–170, 1998.

STERNBERG, E. M. Perspectives Series : Cytokines and the Brain. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 11, p. 2641–2647, 1997.

STERNBERG, E. M. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 4, p. 318–28, abr. 2006. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1783839&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 1 ago. 2012.

SUNDMAN, E. A. et al. Growth Factor and Catabolic Cytokine Concentrations Are Influenced by the Cellular Composition of Platelet-Rich Plasma. **The American Journal of Sports Medicine**, v. 39, p. 2135, 2011.

SZABO, S.; TACHE, Y.; SOMOGYI, A. The legacy of Hans Selye and the origins of stress research : A retrospective 75 years after his landmark brief " Letter " to the Editor of Nature. **Stress**, v. 15, n. September, p. 472–478, 2012.

TANAKA, M. et al. Time-Related Differences in Noradrenaline Turnover in Rat Brain Regions by Stress. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 16, p. 315–319, 1982.

TAVARES, L. D. P. Desenvolvimento da avicultura de. p. 79–88, 2007.

TURNBULL, A. V.; RIVIER, C. Regulation of the HPA Axis By Cytokines. **Brain Behavior and Immunity**, v. 9, p. 253–275, 1995.

KODAIRA, V.; PEREIRA, D. F. ; SOARES, N. M.L. G. de F. B. Concentração de glicose sanguínea e relação heterófilo:linfócito podem ser utilizados como indicadores de estresse térmico para aves poedeiras. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 9, n. 2, p. 182–190, 2015.

VANDENBORNE, K. et al. Corticosterone-induced negative feedback mechanisms within the hypothalamo – pituitary – adrenal axis of the chicken. p. 383–391, 2005.

VILA, L. G.; FIORAVANTI, M. C. S. HEMATOLOGIA EM AVES: Revisão de literatura. **Escola De Veterinária E Zootecnia**, v. Monografia, p. 42, 2013. Disponívelem:<http://ppgca.evz.ufg.br/uploads/67/original_2013_Laura_Garcia_Seminario1corrig.pdf>.

WEBSTER, J. I.; TONELLI, L.; STERNBERG, E. M. Neuroendocrine regulation of immunity. **Annual review of immunology**, v. 20, p. 125–63, jan. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861600>. Acesso em: 16 nov. 2012.

WEISS J.M; BALEY W.H; POHORECKY L.A; KORZENIOWSKI D; GRILLONE G . Stress-induced depression of motor activity correlates with regional changes in brain norepinephrine but not in dopamine. **Neurochem. Res.** 5: 9-22. 1980.

WINDLE, R. J. et al. Oxytocin attenuates stress-induced c-fos mRNA expression in specific forebrain regions associated with modulation of hypothalamo-pituitary-adrenal activity. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 12, p. 2974–82, 24 mar. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15044536>. Acesso em: 3 ago. 2014.

WORLD ANIMAL PROTECTION. **Pork and the superbug crisis : How higher welfare farming is better for pigs and people**.2018.

XIE, H. et al. Effects of Salmonella typhimurium Lipopolysaccharide on Broiler Chickens. **Poultry science**, v. 79, n. II, p. 33–40, 2000.

XIE, J. et al. Subpallial and hypothalamic areas activated following sexual and agonistic encounters in male chickens. **Physiology & behavior**, v. 101, n. 3, p. 344–59, 5 out. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20600197>. Acesso em: 12 ago. 2012.

ZALCMAN, S. et al. Cytokine-specific central monoamine alterations induced by interleukin-1, -2 and -6. **Brain Research**, v. 643, n. 1–2, p. 40–49, 1994.

ZIEGLER, D. R.; HERMAN, J. P. Neurocircuitry of stress integration: anatomical pathways regulating the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis of the rat. **Integrative and comparative biology**, v. 42, n. 3, p. 541–51, jul. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21708749>.