

Aymam Cobo de Figueiredo

Efeitos da injeção de LPS, da alimentação e da
alimentação contaminada na modulação do
sistema imune e endócrino de rãs (*Lithobates
catesbeianus*)

Effects of LPS injection, meal intake and
contaminated meal intake on immune and
endocrine modulation in bullfrogs (*Lithobates
catesbeianus*)

São Paulo

2022

Aymam Cobo de Figueiredo

Efeitos da injeção de LPS, da alimentação e da
alimentação contaminada na modulação do
sistema imune e endócrino de rãs (*Lithobates
catesbeianus*)

Effects of LPS injection, meal intake and
contaminated meal intake on immune and
endocrine modulation in bullfrogs (*Lithobates
catesbeianus*)

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, para a obtenção de título
de Doutora em Ciências, na área de Fisiologia Geral.

Orientador: Dr. Fernando Ribeiro Gomes

Co-orientadora: Dra. Stefanny Christie Monteiro Titon

São Paulo

2022

Cobo de Figueiredo, Aymam

Efeitos da injeção de LPS, da alimentação e da alimentação contaminada na modulação do sistema imune e endócrino de rãs (*Lithobates catesbeianus*) / Aymam Cobo de Figueiredo; orientador Fernando Ribeiro Gomes; coorientadora Stefanny Christie Monteiro Titon -- São Paulo, 2022.

139 p.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Anura. 2. Alimentação. 3. Corticosterona. 4. Desafio imune .5. Resposta imune. I. Gomes, Fernando Ribeiro, orient. II. Titon, Stefanny Christie Monteiro, coorient. III. Título.

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por me proporcionar tudo o que foi necessário para que eu chegasse até aqui, especialmente minha saúde física e mental.

Aos meus pais, José Coelho de Figueiredo e Leonor Ferreira Bueno Cobo, que sempre estiveram presentes, me dando apoio incondicional. Estes são inteiramente responsáveis pela minha formação e sucesso pessoal e profissional, me guiando desde o início da minha vida.

Ao meu orientador, professor Dr. Fernando Ribeiro Gomes, pela oportunidade, acolhimento, direcionamento e postura impecáveis durante essa trajetória. Ao seu zelo e comprometimento com a qualidade e integridade do seu trabalho devo o sucesso desse trabalho final. Muito obrigada pela confiança.

À minha coorientadora, Dra. Stefanny Christie Monteiro Titon, por toda paciência, treinamento, dedicação, ensinamento, aconselhamento e parceria. Muito obrigada por trilhar comigo essa jornada.

Ao meu esposo, Caio Augusto de Almeida Fernandes, por todo apoio e parceria.

Ao professor Dr. José Eduardo de Carvalho, pela base de todos os meus ensinamentos e pela parceria e colaboração durante toda a minha vida acadêmica. Muito obrigada por estar sempre presente.

Às minhas amigas e companheiras de longa data, Ms. Juliana Figueiredo de Lima e Juliana Naomi Tanaka, pelas conversas, desabafos, risadas, apoio e sessões de terapia.

Aos meus amigos e colaboradores Alan Siqueira Lima, Felipe Rangel Floreste, João Cunha Cyrino e Ms. Patrício Garcia Neto. Muito obrigada por toda a colaboração e por tornarem a minha jornada muito mais leve e divertida. Inclusive a você, Débora Meyer de Almeida Prado, que acompanhou tão intensamente essa minha reta final. Muito obrigada pela confiança e por aceitar meus ensinamentos.

A todos os meus colegas do Laboratório de Comportamento e Fisiologia Evolutiva que agregaram imensamente com suas experiências e companhia. À Letícia Adriana Kiim Nogueira pela contribuição principalmente para o terceiro capítulo.

Aos colaboradores do Departamento de Fisiologia Geral, especialmente à Roseli Silva Santos e à Erika H. Takamoto de Camargo pelo apoio e serviço essenciais.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Este trabalho foi financiado por:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP):

Projeto Temático concedido à FRG (2014/16320)

Auxílio regular (2019/24950-4)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)- Finance Code 001.: Bolsa de doutorado concedida a ACF

Programa de Pós-graduação em Fisiologia Geral - Departamento de Fisiologia - Instituto de Biociências - USP - São Paulo.

Departamento de Fisiologia - Instituto de Biociências - USP - São Paulo.

SUMÁRIO

Resumo Geral	15
General Abstract	17
Introdução Geral	19
Modulação imune e endócrina frente a estímulos imunes	19
Trato gastrointestinal e modulação imune e endócrina	22
Trato gastrointestinal e microbiota	24
Objetivos	26
Referências	28
Capítulo 1: Systemic hormonal and immune regulation induced by intraperitoneal LPS injection in bullfrogs (<i>Lithobates catesbeianus</i>)	35
Abstract	36
1.1. Introduction	37
1.2. Materials and methods	39
1.2.1. Frog husbandry	39
1.2.2. Experimental procedure	40
1.2.3. Blood collection	40
1.2.4. Neutrophil/lymphocyte (NL) ratio	40
1.2.5. Phagocytosis (PP) assay	41
1.2.6. Bacterial killing ability (BKA)	42
1.2.7. Hormone assays	42
1.2.8. Parallelism test	43
1.2.9. Statistical analysis	44
1.3. Results	45
1.4. Discussion	51
1.5. Conclusion	53
Acknowledgments	53
References	54
Capítulo 2: Immune and hormonal regulation in the postprandial period of bullfrogs (<i>Lithobates catesbeianus</i>)	60
Abstract	61
2.1. Introduction	62

2.2. Materials and methods	64
2.2.1. Frog husbandry	64
2.2.2. Experimental procedure	65
2.2.3. Blood collection	65
2.2.4. Corticosterone (CORT) assays	65
2.2.5. Neutrophil/lymphocyte (NL) ratio	66
2.2.6. Bacterial killing ability (BKA)	66
2.2.7. Phagocytosis Assay	67
2.2.8. Melatonin (MEL) Assay	68
2.2.9. MEL PI Parallelism test	68
2.2.10. Statistical analysis	69
2.3. Results	70
2.4. Discussion	76
2.5. Conclusion	79
Acknowledgments	80
References	82
Capítulo 3: Immune and hormonal regulation of the <i>Boa constrictor</i> (Serpentes; Boidae) in response to feeding	87
Abstract	88
3.1. Introduction	89
3.2. Materials and methods	92
3.2.1. Animal husbandry	92
3.2.2. Experiment groups	92
3.2.3. Aerobic metabolic rate	93
3.2.4. Blood and tissue sampling	94
3.2.5. Corticosterone (CORT) assay	94
3.2.6. CORT parallelism test	94
3.2.7. Heterophil/lymphocyte (HL) ratio	95
3.2.8. Bacterial killing ability (BKA)	95
3.2.9. Melatonin (MEL) assay	96
3.2.10. Statistical analysis	97
3.3. Results	97
3.4. Discussion	102

3.5. Conclusion	105
Acknowledgments	106
References	107
Capítulo 4: Hormonal and immune modulation in response to contaminated meal intake in bullfrogs (<i>Lithobates catesbeianus</i>)	113
Abstract	114
4.1. Introduction	115
4.2. Materials and methods	118
4.2.1. Frog husbandry	118
4.2.2. Meal contamination	118
4.2.3. Experimental procedure	119
4.2.4. Plasma corticosterone (CORT) assay	120
4.2.5. GIT corticosterone (CORT) assay	120
4.2.6. Neutrophil/lymphocyte (NL) ratio	121
4.2.7. Bacterial killing ability (BKA)	121
4.2.8. Statistical analysis	122
4.3. Results	123
4.4. Discussion	128
4.5. Conclusion	131
Acknowledgments	131
References	132
Conclusões e Considerações Finais	137
Anexo 1 – Certificado CEUA	138

RESUMO GERAL

Tanto em resposta a estímulos imunes, quanto no período absorptivo do alimento, o decurso temporal da ativação imune sistêmica e da modulação das concentrações plasmáticas e locais (no trato gastrointestinal, TGI) de hormônios imunomodulatórios como melatonina e glicocorticoides é bem descrito em mamíferos. Entretanto, pouco se sabe sobre o decurso temporal da modulação imune e hormonal após a injeção de estímulos imunes e durante o período pós-prandial, assim como após a ingestão de alimento contaminado, em animais ectotérmicos. Assim, os objetivos deste trabalho foram investigar: (1) se ocorre a ativação do sistema imune e modulação hormonal pela injeção de um estímulo imune sistêmico em rãs (*Lithobates catesbeianus*); (2) o decurso temporal das mudanças hormonais locais (intestino e estômago) e sistêmicas, e da ativação do sistema imune sistêmico durante o período pós-prandial de rãs e serpentes (*Boa constrictor*) e (3) se ocorre a ativação do sistema imune sistêmico, e modulação hormonal local (estômago e intestino) e sistêmica pela ingestão de alimento contaminado em rãs. Para o objetivo 1, os animais foram divididos em dois grupos, dos quais um grupo recebeu injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS, 2 mg/kg) e outro grupo recebeu injeção de salina (controle). O sangue dos animais foi coletado 6 h e 24 h após o tratamento e a ativação do sistema imune foi quantificada pelo perfil leucocitário, capacidade bactericida plasmática e atividade fagocítica de leucócitos sanguíneos. Foram medidos ainda as concentrações plasmáticas de corticosterona e melatonina. A injeção intraperitoneal de LPS aumentou a razão neutrófilo/linfócito e a atividade de fagocitose 24 h após o tratamento, além de diminuir as concentrações plasmáticas de melatonina e testosterona, corroborando a ideia de que a injeção de LPS induz a resposta inflamatória sistêmica em rãs. Para o segundo objetivo, as rãs foram alimentadas com ração correspondente a 5% da sua massa corpórea e divididas em cinco grupos: 6 h, 24 h, 48 h, 96 h e 168 h após a alimentação forçada e após a manipulação bucal que mimetizou a alimentação forçada (grupos controle). Já as serpentes foram divididas em dois grupos: alimentadas com camundongos correspondente a 30% da sua massa corpórea e jejum, sendo as amostras tomadas concomitantemente nos dois grupos (48 h após a alimentação do grupo alimentado). As mesmas variáveis do experimento 1 foram mensuradas, mais a concentração de melatonina no TGI (estômago e intestino). A alimentação alterou a razão neutrófilo e heterófilo/linfócito, e as concentrações de corticosterona plasmática dos dois

modelos animais, além de diminuir a capacidade bactericida plasmática das rãs. O jejum (grupos controle) ainda aumentou a concentração de melatonina no estômago das rãs e apresentou a mesma tendência no estômago e no intestino das jiboias. Os resultados indicaram que o aumento de corticosterona plasmática pode ser necessário para mobilização de reservas energéticas essenciais para sustentar a digestão do alimento, e que a melatonina talvez possa atuar na proteção dos tecidos durante períodos de jejum. Para o objetivo 3, as rãs foram alimentadas com 2% da sua massa corpórea e divididas em três grupos: alimentadas três vezes com ração esterilizada (luz UV), alimentadas duas vezes com ração esterilizada e uma vez com ração contaminada com bactérias vivas *Aeromonas hydrophila* (10^9 UFC/ml), e alimentadas três vezes com ração contaminada com bactérias vivas. Os tecidos foram coletados 24 h após os tratamentos e as mesmas variáveis do experimento 1 foram mensuradas, mais a concentração de corticosterona no TGI (estômago e intestino). Nenhuma das variáveis testadas foi afetada pela ingestão do alimento contaminado, porém as concentrações de corticosterona do estômago tenderam a ser menores no grupo alimentado três vezes com alimento contaminado. Dessa forma, a ingestão de refeição contaminada não foi capaz de provocar disbiose e ativar respostas inflamatórias sistêmica. No entanto, a tendência de diminuição das concentrações de corticosterona no estômago possivelmente contribui para prevenir a transmigração da bactéria para órgãos fora do TGI e para permitir a montagem de respostas inflamatórias e imunológicas locais.

Palavras-chave: anura, alimentação, corticosterona, desafio imune, resposta imune.

GENERAL ABSTRACT

Both in response to immune stimulus and in the meal absorptive period, the time course of systemic immune activation and modulation of plasma and local levels (in the gastrointestinal tract, GIT) of immunomodulatory hormones such as melatonin and glucocorticoids, is well described to mammals. However, little is known about the time course of immune and hormonal modulation after injection of immune stimulus and during the postprandial period, as well as after contaminated meal intake, in ectothermic animals. Thus, the aims of this study were investigate: (1) if the activation of the immune system and hormonal modulation occurs due to the injection of a systemic immune stimulus in bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*); (2) the time course of GIT (intestine and stomach) and systemic hormonal modulation and activation of the systemic immune system during the postprandial period of bullfrogs and snakes (*Boa constrictor*); and (3) if systemic immune activation and GIT (stomach and intestine) and systemic hormonal modulation occurs due to the contaminated meal intake in bullfrogs. For aim 1, the animals were divided into two groups. One group received an intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS, 2 mg/kg) and the other group received an intraperitoneal saline injection (control group). Animals' blood was collected 6 h and 24 h after treatment and the immune system activation was quantified by the leukocyte profile, plasma bacterial killing ability and phagocytic activity of blood leukocytes. Plasma levels of corticosterone and melatonin were also quantified. Intraperitoneal injection of LPS increased the neutrophil/lymphocyte ratio and phagocytosis activity 24 h after treatment and decreased melatonin and testosterone plasma levels, supporting the idea that LPS injection induces a systemic inflammatory response in bullfrogs. For the second aim, the bullfrogs were fed with fish feed (5% of their body mass) and divided into five groups: 6 h, 24 h, 48 h, 96 h and 168 h after forced feeding and after oral manipulation that mimicked forced feeding (control groups). Snakes were divided into two groups: fed with mice (30% of their body mass) and fasting, with samples taken concomitantly in both groups (48 h after feeding of fed group). The same variables as in experiment 1 were measured, plus melatonin levels in the GIT (stomach and intestine). Feeding altered the neutrophil and the heterophil/lymphocyte ratio, and the plasma corticosterone levels in both animal models, in addition to decreasing plasma bacterial killing ability in the bullfrogs. Fasting (control groups) also increased melatonin levels in the stomach of bullfrogs and showed the same

trend in the stomach and intestine of the boas. These results indicated that increased plasma corticosterone levels may be necessary to mobilize energy reserves essential to support meal digestion, and that melatonin may act protecting tissues during periods of fasting. For aim 3, the bullfrogs were fed with fish feed (2% of their body mass) and divided into three groups: fed three times with sterilized feed (UV light), fed twice with sterilized feed and once with feed contaminated with live bacteria *Aeromonas hydrophila* (10^9 CFU/ml), and fed three times with feed contaminated with live bacteria. Tissues were collected 24 h after treatments and the same variables as in experiment 1 were measured, plus the corticosterone levels in the GIT (stomach and intestine). None of the variables was affected by contaminated meal intake. However, stomach corticosterone levels tended to be lower in the group fed three times with contaminated feed. Thus, ingestion of contaminated meal was not able to provoke dysbiosis and activate systemic inflammatory responses. However, the tendency of decreasing corticosterone levels in the stomach possibly contributes to preventing the transmigration of the bacteria to organs outside the GIT, besides to allow the mounting of local (GIT) inflammatory and immune responses.

Keywords: anura, corticosterone, feeding, immune challenge, immune response.

INTRODUÇÃO GERAL

Modulação imune e endócrina frente a estímulos imunes

As defesas do hospedeiro contra os desafios externos são amparadas por um sistema imunológico integrado composto pelas imunidades inata e adaptativa, que induzem respostas imunológicas tanto locais quanto sistêmicas (Hooper, et al., 2012). A imunidade inata representa a primeira linha de defesa do organismo e é responsável pela resposta aguda de recrutamento de células como macrófagos e neutrófilos, e pela produção de citocinas que modulam as respostas imunológicas (Anisman, 2009; Robert and Ohta, 2009). A imunidade adaptativa representa a imunidade específica e de memória, que atua principalmente através da produção de anticorpos pelos linfócitos B e T (Robert and Ohta, 2009). Nos vertebrados, as células do sistema imunológico inato utilizam essencialmente receptores do tipo Toll (TLR, do inglês *Toll-like receptors*) para reconhecer a microbiota potencialmente patogênica e assim ativar cascatas de sinalização que controlam finamente a produção de substâncias antimicrobianas e de quimiocinas (Leulier and Lemaitre, 2008). A partir do reconhecimento, o controle da ativação e modulação do sistema imune é realizado por um conjunto de sinais químicos, dentre os quais podemos destacar a ação hormonal (Paavonen, 2016).

Um dos importantes moduladores da resposta imune inata e adaptativa é o hormônio melatonina ou MEL (Szczepanik, 2007; Singh and Singh, 2012; Markus et al., 2018). Na imunidade inata, a fagocitose de leucócitos circulantes exhibe pico de atividade durante a noite, concomitante ao pico de produção de MEL pela glândula pineal (i.e. Singh and Singh, 2012). Nesse contexto, a MEL desempenha ação anti-inflamatória, dificultando o recrutamento e a adesão celular nos tecidos inflamatórios (Lotufo et al., 2001). Já na imunidade adaptativa, a MEL é capaz de ativar linfócitos T e B via receptores de MEL e assim modular a proliferação dessas células e a produção de citocinas (Cardinali et al., 1999; Szczepanik, 2007). Dessa forma, quando a glândula pineal detecta os padrões moleculares associados à patógenos apresentados pela microbiota invasora ou por um desafio imune, há a inibição de síntese e secreção de MEL pineal (Markus et al., 2018). Com essa diminuição de MEL sistêmica, há então o aumento da migração de leucócitos para o sítio de infecção, possibilitando a montagem da resposta inflamatória (Markus et al., 2018). As células imunes ativadas no sítio de infecção aumentam então a

produção e secreção local de MEL, aumentando respostas imunes locais como a eficiência fagocítica de macrófagos peritoneais e mastócitos em camundongos, por exemplo (Barriga et al., 2002; Pires-Lapa et al., 2013). Localmente, a MEL ainda desempenha funções antioxidantes e anti-inflamatórias, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, por exemplo - protegendo assim as células e tecidos de danos oxidativos e inflamatórios (Acuña-Castroviejo et al., 2014). A inibição de produção de MEL pineal e o aumento da produção de MEL por leucócitos locais que desencadeiam respostas inflamatórias frente a estímulos imunes é conhecido como eixo imune-pineal (Markus et al., 2018).

Os hormônios glicocorticoides, como cortisol e corticosterona/CORT, representam outro importante grupo de sinais químicos imunomoduladores. Estressores, incluindo desafios imunológicos, estimulam o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal/interrenal (HPA/HPI) resultando na liberação de glicocorticoides (Elenkov and Chrousos, 2002; Selechnik et al., 2017). Anfíbios anuros, por exemplo, aumentam as concentrações plasmáticas de CORT poucas horas após a aplicação de desafios imunológicos (Bastos et al., 2021; Ferreira et al., 2021; Titon Jr et al., 2021). Os efeitos imunomodulatórios dos glicocorticoides, por sua vez, são complexos e podem ser desde imunoestimulantes até imunossupressores, na dependência de fatores como a intensidade e duração do estímulo (Elenkov and Chrousos, 2002). Dentre os efeitos imunoestimulantes, a elevação da concentração plasmática de glicocorticoides aumenta a atividade de fagocitose no sangue de anuros e mamíferos e nos macrófagos peritoneais de camundongos, por exemplo (Zhou et al., 2010; Assis et al., 2017; Cain and Cidlowski, 2017). Além disso, a elevação aguda de CORT aumenta o número de heterófilos circulantes em aligatores *Alligator mississippiensis* (Morici et al., 1997), e está positivamente relacionada com a capacidade bactericida plasmática (BKA) em serpentes *Thamnophis elegans* e *Thamnophis sirtalis* (Spence et al., 2020). Por outro lado, uma vez que o desafio imune é controlado pelo sistema imunológico e se inicia a fase de resolução da resposta inflamatória, os glicocorticoides desencadeiam efeitos imunossupressores (Fernandes et al., 2009). Durante essa fase, os glicocorticoides inibem a síntese de citocinas e mediadores pró-inflamatórios, restauram a produção de MEL pineal, contribuem para parar a migração celular e, conseqüentemente, restauram a homeostase e previnem danos aos tecidos (Fernandes et al., 2009).

O hormônio sexual testosterona é outro exemplo de hormônio que desempenha complexas ações imunomoduladoras. Altas concentrações plasmáticas de testosterona foram correlacionadas positivamente com a resposta imune inata em diversos vertebrados (Foo et al., 2016). Além disso, em anuros que apresentam boa condição corpórea, altas concentrações plasmáticas de testosterona estão associadas à maior atividade de fagocitose de leucócitos sanguíneos (Titon et al., 2017, 2018) e ao aumento do edema em resposta à injeção do estímulo imune fitohemaglutinina (Desprat et al., 2015). Por outro lado, diversos efeitos imunossupressores foram descritos para testosterona, incluindo a redução da expressão do receptor Toll-like 4 (TLR4, ativador da resposta imune inata) em macrófagos de camundongos (Rettew et al., 2008), bem como a diminuição do edema dos pés de lagartos em resposta à injeção de fitohemaglutinina (Belluire et al., 2004). Desta forma, a testosterona age através de complexos mecanismos e seus efeitos imunomoduladores dependem de fatores como condição corpórea do indivíduo e de outros sinais endócrinos, tais como das concentrações plasmáticas de glicocorticoides (Roberts and Peters, 2009; Titon et al., 2018).

A substância lipopolissacarídeo (LPS), principal componente da membrana externa de bactérias gram-negativas, tem sido muito utilizada como desafio imunológico em diferentes espécies (Leulier et al., 2003; Llewellyn et al., 2010; Gardner et al., 2018). O LPS é reconhecido pelo receptor TLR4 presente nas células de mamíferos como monócitos, linfócitos B, neutrófilos, mastócitos e macrófagos (Triantafyllou and Triantafyllou, 2002). Em diversos tecidos de anfíbios como pele, pulmão, intestino, baço, fígado, estudos apontam a presença de receptores homólogos ao TLR4 de mamíferos (Ishii et al., 2007). Apesar de sabermos que o LPS é capaz de alterar a secreção de hormônios imunomoduladores e a produção de citocinas pró-inflamatórias, ativando respostas imunes principalmente nas primeiras 8 horas após o tratamento (Ulevitch and Tobias, 1999; Janský et al., 2003; Cardoso et al., 2006), pouco sabemos como essas respostas hormonais e imunológicas são moduladas a longo prazo após a administração do estímulo imune. Estudos realizados principalmente com anfíbios anuros têm focado nos efeitos imunes e hormonais imediatamente após o tratamento (i.e. Gardner et al., 2018 e Bastos et al., 2021 com medições 2 h após o tratamento), com raros estudos sendo realizados com medições às 6 h e 24 h após a administração do desafio imune (Zou et al., 2000; Ferreira et al., 2021; Titon et al., 2021). Desta forma, os efeitos prolongados das

respostas fisiológicas - principalmente hormonais e imunológicas - frente a desafios imunes precisam ser melhor caracterizados em anuros.

Trato gastrointestinal e modulação imune e endócrina

O trato gastrointestinal (TGI) compreende uma extensa mucosa com ampla superfície que otimiza a absorção dos conteúdos alimentares. A mucosa é seletiva à passagem de potenciais patógenos que podem ser ingeridos e, apesar do funcionamento e manutenção do TGI apresentar íntima relação com a microbiota comensal, o contato com a microbiota estranha pode alterar e até prejudicar as funções do aparelho digestório (Cerf-Bensussan and Gaboriau-Routhiau, 2010). As defesas do hospedeiro contra esses patógenos são amparadas por um sistema imunológico integrado, composto pelas imunidades inata e adaptativa, que induzem respostas imunológicas tanto sistêmicas quanto locais - através dos tecidos linfoides associados às mucosas (Galdeano and Perdigón, 2006). No TGI da maioria dos vertebrados, o sistema imune inato do tecido linfático intestinal - GALT, (do inglês *gut-associated lymphoid tissue*) fornece a primeira linha de defesa contra microrganismos potencialmente patogênicos, impedindo a penetração destes para o meio interno, além de fornecer os sinais biológicos que guiam o sistema imunológico adaptativo (Goldstine et al., 1975; Perdigo'n et al., 2001; Hooper et al., 2012).

Aliadas ao GALT, as células epiteliais são um componente central do sistema imunológico intestinal. De maneira semelhante às células imunes, as células epiteliais do intestino expressam receptores que reconhecem os padrões moleculares associados à microbiota (Spahn and Kucharzik, 2004). Esses receptores ativam cascatas de sinalização que controlam finamente a produção de substâncias antimicrobianas e quimiocinas pelo GALT, dependendo dos sinais que são entregues pela microbiota (Spahn and Kucharzik, 2004). Sabe-se que a ingestão de dietas ricas em bactérias ou em LPS por roedores, por exemplo, é capaz de ativar os receptores epiteliais e aumentar a porcentagem de linfócitos T no GALT, além de aumentar a produção da interleucina-12, uma das principais mediadoras da imunidade inata (Galdeano and Perdigón, 2006; Hrcir, et al., 2008). Sabe-se ainda, que a presença de bactérias potencialmente patogênicas (*Salmonella typhimurium*) no intestino de camundongos ativa os macrófagos entéricos altamente especializados através de um eixo neuro-imune, resultando em uma rápida resposta de

proteção local (Gabanyi et al., 2016). Pouco se sabe, porém, como e se esses estímulos imunes e a resposta imune local gerada pelo GALT é capaz de recrutar e modular a imunidade inata sistêmica dos animais (Valpotic et al., 2016).

A modulação da imunidade inata sistêmica é, entretanto, observada através de um outro importante estímulo no TGI: a alimentação propriamente dita. Durante o período pós-prandial - período após a alimentação em que os processos de digestão, absorção e assimilação dos nutrientes ocorrem - humanos, por exemplo, exibem modulação sistêmica do sistema imune inato, apresentando aumento da razão neutrófilo/linfócito (NL ratio) e de plaquetas circulantes no sangue logo após a alimentação (Hansen et al., 1997). O estudo de Hansen e colaboradores (1997) mostra ainda uma modulação hormonal no período pós-prandial, com o aumento das concentrações plasmáticas de glicocorticoides nesse período. Para animais ectotérmicos, os resultados parecem ser semelhantes aos de mamíferos. Segundo Luoma e colaboradores (2016), serpentes (*Pantherophis guttatus*) apresentam uma maior hemaglutinação no plasma 24 h após a ingestão do alimento do que logo após a digestão (sétimo dia após a alimentação), ou seja, houve uma maior ativação da resposta imune inata durante o período absorptivo do alimento. Estudos mostram ainda que anfíbios anuros (*Xenopus laevis*) exibem um pico de CORT plasmática às 6 h de pós-prandial (Crespi *et al.*, 2004). Não se sabe, porém, qual o decurso temporal da modulação hormonal e imunológica durante o período pós-prandial em animais ectotérmicos.

A secreção de outro importante hormônio imunomodulador, a MEL, também é modulada no período pós-prandial. O TGI é a maior fonte de MEL extra pineal e a produção local contribui inclusive para as concentrações sistêmicas de MEL em mamíferos (Bubenik, 2001). No TGI, a MEL é produzida pelas células enterocromafins presentes na mucosa do estômago e atua como hormônio parácrino em outros segmentos do trato (Bubenik, 2001). Ao contrário da MEL produzida pela glândula pineal, a produção pela mucosa intestinal parece não estar relacionada ao fotoperíodo e sim à frequência de alimentação, sendo que mamíferos (humanos e porcos) apresentam um aumento de secreção de MEL no TGI logo após a ingestão do alimento (Bubenik et al., 1996). Arelada à alimentação, a MEL desempenha funções de proteção à mucosa e de sincronização dos processos digestivos (Bubenik, 2001). Além de ser um hormônio facilitador da digestão, a MEL também desempenha funções protetoras essenciais no TGI, sendo que concentrações elevadas de MEL foram encontradas no TGI de mamíferos

em restrição alimentar, por exemplo (Huether, 1994; Bubenik et al., 1992; Bubenik, 2001). Em camundongos, é observado o aumento das concentrações de MEL na maior parte do TGI após períodos de jejum de 48 h, sendo o aumento da MEL no estômago mais pronunciado (2 vezes maior do que em outras partes do TGI, Bubenik et al., 1992). A produção elevada de MEL estomacal protege o TGI, reduzindo a incidência e a gravidade de danos aos tecidos, como úlceras gástricas em porcos, por exemplo (Ayles et al., 1996). Em animais ectotérmicos (peixes, serpentes e anuros) também são encontradas altas concentrações de melatonina no TGI em jejum (Bubenik and Pang, 1997), porém não se sabe como ocorre a modulação da produção de MEL em resposta à alimentação nesses animais.

Trato gastrointestinal e microbiota

A mucosa do TGI é colonizada por uma comunidade de microbiota ampla, complexa e dinâmica, composta por microrganismos considerados não patogênicos (Wolowczuk et al., 2008; Carding et al., 2015). Essa microbiota comensal saudável participa de funções essenciais do hospedeiro, como auxiliar na extração de energia, vitaminas e nutrientes dos alimentos; bem como proteger o hospedeiro contra a invasão e colonização de patógenos oportunistas (Wolowczuk et al., 2008). Por outro lado, quando há disbiose devida a alterações na composição da microbiota intestinal com expansão da microbiota patogênica e/ou com redução da microbiota comensal, pode ocorrer distúrbios sistêmicos e no TGI, prejudicando a saúde do hospedeiro (Levy et al., 2017). A microbiota intestinal é extremamente dependente da nutrição do hospedeiro e, dentre vários fatores que afetam a homeostase da microbiota intestinal, a composição da dieta é um dos principais componentes, melhorando as funções intestinais ou provocando disbiose e inflamação intestinal (Panasevich et al., 2018; Wang et al., 2020; Frankiensztajn et al., 2020).

Quando as células epiteliais da mucosa intestinal entram em contato com a microbiota ingerida, o reconhecimento do microrganismo desencadeia a modulação das funções imunes sistêmica e local (Spahn and Kucharzik, 2004; Lyte et al., 2010). Em mamíferos, por exemplo, a ingestão de bactérias *Lactobacillus casei* ativa os receptores intestinais e, conseqüentemente, o sistema imunológico da mucosa intestinal (Galdeano and Perdígón, 2006). Em animais ectotérmicos, uma dieta rica em probióticos diminui a

porcentagem de neutrófilos circulantes no sangue de peixes tilápias-do-nilo *Oreochromis niloticus*; além de aumentar a atividade fagocítica de leucócitos no sangue tanto de tilápias-do-nilo quanto de rãs-touro *Lithobates catesbeianus* (Dias et al., 2010; Ibrahim, et al., 2019). Concomitante com a microbiota benéfica, patógenos oportunistas também podem ser ingeridos e suas endotoxinas - como LPS por exemplo - podem se deslocar do lúmen para os tecidos internos quando há disbiose, ativando as respostas imunes locais do hospedeiro (Ringø et al., 2007). Uma dieta rica em LPS estimula a expansão das células B e T no GALT e nos linfonodos mesentéricos de camundongos *germ-free* (que não possuem microbiota comensal), além de aumentar a produção de interleucina-12 no baço (Hrncir, et al., 2008). Da mesma forma, a presença de bactérias potencialmente patogênicas *Salmonella typhimurium* no intestino de camundongos ativa macrófagos entéricos especializados e desencadeia rápidas respostas de proteção local (Gabanyi et al., 2016). No entanto, apesar de sabermos que dietas ricas em probióticos modulam parâmetros imunes sistêmicos de animais ectotérmicos convencionais - que possuem microbiota comensal (Dias et al., 2010; Ibrahim, et al., 2019) - e que a ingestão de patógenos ativa respostas de proteção local em mamíferos (Gabanyi et al., 2016), pouco se sabe se a presença de patógenos oportunistas no TGI é capaz de modular a resposta imune inata sistêmica em animais ectotérmicos.

A composição da microbiota intestinal também influencia o sistema endócrino, modulando a produção e secreção de hormônios glicocorticoides. Camundongos *germ-free* submetidos ao estresse de restrição, por exemplo, exibem uma maior elevação das concentrações plasmáticas de CORT quando comparados à camundongos que possuem microbiota comensal (Sudo et al., 2004). Por outro lado, a ingestão de probióticos pelos camundongos *germ-free* reverte o aumento exacerbado de CORT no sangue desses animais, indicando que uma microbiota intestinal em equilíbrio desempenha funções protetoras contra os efeitos deletérios das concentrações elevadas de glicocorticoides no plasma (Sudo et al., 2004). Da mesma forma, dietas ricas em gordura induzem alterações na microbiota intestinal de camundongos, regulando negativamente a atividade do eixo HPA e, conseqüentemente, diminuindo as concentrações plasmáticas de CORT (Auvinen et al., 2012; Daniel et al., 2014). Na direção oposta, a exposição a estressores e a conseqüente liberação de glicocorticoides pode afetar a fisiologia do TGI, aumentando a permeabilidade da mucosa e a secreção de ácido gástrico, diminuindo a motilidade do estômago e do intestino, e modificando o equilíbrio da microbiota comensal (Meddings

and Swain, 2000; Galley and Bailey, 2014). Além disso, diversos tecidos extra adrenais sintetizam glicocorticoides, e estudos indicam que estes são produzidos localmente na mucosa do TGI em resposta à ativação de células imunes, contribuindo para a montagem das respostas imunes locais (Kostadinova et al., 2014). No entanto, embora alguns estudos tenham se dedicado a examinar a modulação sistêmica endócrina e imunológica durante o período pós-prandial, não se sabe se a ingestão de alimentos contendo potenciais patógenos é capaz de modular parâmetros hormonais e imunológicos sistêmicos. Os processos de alimentação podem promover a ingestão de patógenos oportunistas e provocar disbiose, possivelmente ativando respostas imunes sistêmicas, além das respostas imunes locais conhecidas. De fato, alguns animais que ingerem um maior número de patógenos durante a alimentação, como o abutre-preto *Aegyptius monachus* por exemplo, apresentam maior expressão de genes relacionados a funções imunes no sangue do que outras espécies (Chung et al., 2015).

Objetivos

Com isso, os objetivos deste trabalho foram investigar:

(1) se ocorre a ativação do sistema imune sistêmico, e modulação hormonal pela injeção de um estímulo imune em rãs (*L. catesbeianus*);

(2) o decurso temporal da modulação hormonal local (intestino e estômago) e sistêmica, e da ativação do sistema imune sistêmico durante o período pós-prandial de rãs (*L. catesbeianus*) e serpentes (*B. constrictor*);

(3) se ocorre a ativação do sistema imune sistêmico, e modulação hormonal local (estômago e intestino) e sistêmica pela ingestão de alimento contaminado em rãs (*L. catesbeianus*).

Especificamente, testamos as seguintes hipóteses: I. a injeção intraperitoneal de um estímulo imune ativa uma resposta imune inata sistêmica e modula o perfil hormonal sistêmico dos animais; II. durante o período pós-prandial ocorre a ativação do sistema imune inato sistêmico e a modulação do perfil hormonal sistêmico e local (TGI) dos animais; e III. a presença de microbiota potencialmente patogênica no alimento ativará uma resposta imune inata sistêmica e modulará o perfil hormonal sistêmico e local (TGI) dos animais. Desta forma, o este trabalho está dividido em quatro capítulos. O primeiro capítulo intitulado “Systemic hormonal and immune regulation induced by

intraperitoneal LPS injection in bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*)” contempla o objetivo (1) e a hipótese I. O segundo capítulo intitulado “Immune and hormonal regulation in the postprandial period of bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*)” contempla o objetivo (2) e a hipótese II em rãs *L. catesbeianus*, assim como o terceiro capítulo intitulado “Immune and hormonal regulation of the *Boa constrictor* (Serpentes; Boidae) in response to feeding” contempla o mesmo objetivo e hipótese em serpentes *B. constrictor*. Por fim, o quarto e último capítulo intitulado “Hormonal and immune modulation in response to contaminated meal intake in bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*)” contempla o objetivo (3) e a hipótese III.

Referências

- Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Venegas, C., Díaz-Casado, M.E., Lima-Cabello, E., López, L.C., Rosales-Corral, S., Tan, D.X., Reiter, R.J., 2014. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol. Life Sci.* 71, 2997–3025.
- Anisman, H., 2009. Cascading effects of stressors and inflammatory immune system activation: implications for major depressive disorder. *J. Psychiatry Neurosci.* 34, 4–20.
- Assis, V.R., Titon, S.C.M., Queiroz-Hazarbassanov, N.G.T., Massoco, C.O., Gomes, F.R., 2017. Corticosterone transdermal application in toads (*Rhinella icterica*): effects on cellular and humoral immunity and steroid plasma levels. *J. Exp. Zool.* 327, 200–213.
- Auvinen, H.E., Romijn, J.A., Biermasz, N.R., Pijl, H., Havekes, L.M., Smit, J.W., Rensen, P.C., Pereira, A.M., 2012. The effects of high fat diet on the basal activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in mice. *J. Endocrinol.* 214, 191-197.
- Ayles, H.L., Ball, R.O., Friendship, R.M., Bubenik, G.A., 1996. The effect of graded levels of melatonin on performance and gastric ulcers in pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 76. doi: 10.4141/cjas96-089
- Barriga, C., Martín, M.I., Ortega, E., Rodriguez, A.B., 2002. Physiological concentrations of melatonin and corticosterone in stress and their relationship with phagocytic activity. *J. Neuroendocrinol.* 14, 691–695.
- Bastos, P.R.O., Titon, S.C.M., Titon, J.B., Gomes, F.R., Markus, R.P., Ferreira, Z.S., 2021. Daily and LPS-induced variation of endocrine mediators in cururu toads (*Rhinella icterica*). *Chronobiol. Int.* 39, 89-96.
- Belliure, J., Smith, L., Sorci, G., 2004. Effect of testosterone on T cell-mediated immunity in two species of mediterranean lacertid lizards. *J. Exp. Zool. Part A* 301, 411–418.
- Bubenik, G.A., 2001. Localization, physiological significance and possible clinical implication of gastrointestinal melatonin. *Biol. Signals Recept.* 10, 350–366.
- Bubenik, G.A., Ball, R.O., Pang, S.F., 1992. The effect of food deprivation on brain and gastrointestinal tissue levels of tryptophan, serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, and melatonin. *J. Pineal Res.* 12, 7-16.

- Bubenik, G.A., Pang, S.F., Hacker, R.R., Smith, P.S., 1996. Melatonin concentrations in serum and tissues of porcine gastrointestinal tract and their relationship to the intake and passage of food. *J. Pineal. Res.* 21, 251-256.
- Bubenik, G.A., Pang, S.F., 1997. Melatonin levels in the gastrointestinal tissues of fish, amphibians, and a reptile. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106, 415–419.
- Cain, D.W., Cidlowski, J.A., 2017. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 233-247.
- Cardinali, D.P., Brusco, L.I., Cutrera, R.A., Castrillón, P., Esquifino, A.I., 1999. Melatonin as a time-meaningful signal in circadian organization of immune response. *Biol. Signals Recept.* 8, 41–48.
- Cardoso, P.G., Macedo, G.C., Azevedo, V., Oliveira, S.O., 2006. *Brucella spp* noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system. *Microb. Cell. Fact.* 5, 13.
- Cerf-Bensussan, N., Gaboriau-Routhiau, V., 2010. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nature Reviews Immunology* 10, 735–744.
- Chung, O., Jin, S., Cho, Y.S., Lim, J., Kim, H., Jho, S., Kim, H.-M., Jun, J., Lee, H., Chon, A., Ko, J., et al., 2015. The first whole genome and transcriptome of the cinereous vulture reveals adaptation in the gastric and immune defense systems and possible convergent evolution between the Old and New World vultures. *Genome Biol.* 16, 215.
- Crespi, E.J., Vaudry, H., Denver, R.J., 2004. Roles of corticotropin-releasing factor, neuropeptide y and corticosterone in the regulation of food intake in *Xenopus laevis*. *J. Neuroendocrinol.* 16, 279-288.
- Daniel, H., Gholami, A.M., Berry, D., Desmarchelier, C., Hahne, H., Loh, G., Mondot, S., Lepage, P., Rothballer, M., Walker, A., 2014. High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. *ISME J.* 8, 295-308.
- Desprat, J.L., Lengagne, T., Dumet, A., Desouhant, E., Mondy, N., 2015. Immunocompetence handicap hypothesis in treefrog: trade-of between sexual signals and immunity? *Behav. Ecol.* 26, 1138–1146.
- Dias, D. de C., De Stéfani, M.V., Ferreira, C.M., França, F.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., Santos, A.A., 2010. Haematologic and immunologic parameters of bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*, fed probiotics. *Aquaculture Research*. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02390.x

- Elenkov, I.J., Chrousos, G.P., 2002. Stress hormones, pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 966, 290–303.
- Fernandes, P.A.C.M., Bothorel, B., Clesse, D., Monteiro, A.W.A., Calgari, C., Raison, S., Simonneaux, V., Markus, R.P., 2009. Local corticosterone infusion enhances nocturnal pineal melatonin production *In Vivo*. *J. Neuroendocrinol.* 21, 90–97.
- Ferreira, L.F., Garcia Neto, P.G., Titon, S.C.M., Titon, B. Muxel, S.M., Gomes, F.R., Assis, V.R., 2021. Lipopolysaccharide regulates pro- and anti-inflammatory cytokines, corticosterone, and melatonin in toads. *Integr. org. biol.* 3, 1-11.
- Foo, Y.Z., Nakagawa, S., Rhodes, G., Simmons, L.W., 2016. The effects of sex hormones on immune function: a meta-analysis. *Biol. Rev.* 92, 551–571.
- Frankiensztajn, L.M, Elliott, E., Koren. O., 2020. The microbiota and the hypothalamus-pituitary-adrenocortical (HPA) axis, implications for anxiety and stress disorders. *Curr. Opin. Neurobiol.* 62, 76–82.
- Gabanyi, I., Muller, P.A., Feighery, L., Oliveira, T.Y., Costa-Pinto, F.A., Mucida, D., 2016. Neuro-immune interactions drive tissue programming in intestinal macrophages. *Cell* 164, 378–391.
- Galdeano, C.M., Perdigon, G., 2006. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 219–226.
- Galley, J.D., Bailey, M.T., 2014. Impact of stressor exposure on the interplay between commensal microbiota and host inflammation. *Gut Microbes.* 5, 390–396.
- Gardner, S., Assis, V.R., Zhao, H., Gomes, F.R., Peatman, E., Mendonça, M.T., 2018. Differential gene expression to an LPS challenge in relation to exogenous corticosterone in the invasive cane toad (*Rhinella marina*). *Dev. Comp. Immunol.* 88, 114–123.
- Goldstine, S.N., Manickavel, V., Cohen, N., 1975. Phylogeny of gut-associated lymphoid tissue. *Amer. Zool.* 15, 107-118.
- Hansen, K., Sickelmann, F., Pietrowsky, R., Fehm, H.L., Born, J., 1997. Systemic immune changes following meal intake in humans. *Am. J. Physiol.* 548-553.
- Hooper, L.V., Littman, D.R., Macpherson, A.J., 2012. Review: interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 336, 1268-1273.

- Hrcir, T., Stepankova, R., Kozakova, H., Hudcovic, T., Tlaskalova-Hogenova, H., 2008. Gut microbiota and lipopolysaccharide content of the diet influence development of regulatory T cells: studies in germ-free mice. *BMC Immunology*, 9:65.
- Huether, G., 1994. Melatonin synthesis in the gastrointestinal tract and the impact of nutritional factors on circulating melatonin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 719, 146-158.
- Ibrahim, M.A., Ismail, Z.H., Emeish, F.A.W., Hassan, H.A., 2019. Effects of dietary compound probiotics on the growth performance and innate immune response of Nile Tilapia. *Assiut. Vet. Med. J.* 65, 112-119.
- Ishii, A., Kawasaki, M., Matsumoto, M., Tochinai, S., Seya, T., 2007. Phylogenetic and expression analysis of amphibian *Xenopus* Toll-like receptors. *Immunogenetics* 59, 281–293.
- Janský, L., Reymanová, P., Kopecký, J., 2003. Dynamics of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by LPS or infected by borrelia. *Physiol. Res.* 52, 593–598.
- Kostadinova, F., Schwaderer, J., Sebeo, V., Brunner, T., 2014. Why does the gut synthesize glucocorticoids? *Ann. Med.* 46, 490–497.
- Leulier, F., Lemaitre, B., 2008. Toll-like receptors-taking an evolutionary approach. *Nat. Rev. Genet.* 9, 165–178.
- Leulier, F., Parquet, C., Pili-Floury, S., Ryu, J., Caroff, M., Lee, W., Mengin-Lecreulx, D., Lemaitre, B., 2003. The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nat. Immunol.* 4, 478–484.
- Levy, M., Kolodziejczyk, A., Thaïss, C., Elinav, E., 2017. Dysbiosis and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 219-232.
- Llewellyn, D., Brown, G.P., Thompson, M.B., Shine, R., 2010. Behavioral responses to immune-system activation in an anuran (the cane toad, *Bufo marinus*): field and laboratory studies. *Physiol. Biochem. Zool.* 84, 77–86.
- Lotufo, C.M., Lopes, C., Dubocovich, M.L., Farsky, S.H., Markus, R.P., 2001. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur. J. Pharmacol.* 430, 351–357.
- Luoma, R.L., Butler, M.W., Stahlschmidt, Z.R., 2016. Plasticity of immunity in response to eating. *J. Exp. Biol.* 219, 1965-1968.
- Lyte, M., Vulchanova, L., Brown, D.R., 2010. Stress at the intestinal surface: catecholamines and mucosa–bacteria interactions. *Cell Tissue Res.* 343, 23–32.

- Markus, R.P., Fernandes, P.A., Kinker, G.S., da Silveira Cruz-Machado, S., Marçola, M., 2018. Immune-pineal axis—acute inflammatory responses coordinate melatonin synthesis by pinealocytes and phagocytes. *Br. J. Pharmacol.* 175, 3239–3250.
- Meddings, J.B., Swain, M.G., 2000. Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat. *Gastroenterology* 119, 1019-1028.
- Morici, L.A., Elsey, R.M., Lance, V.A., 1997. Effects of long-term corticosterone implants on growth and immune function in juvenile alligators, *Alligator mississippiensis*. *J. Exp. Zool.* 279, 156-162.
- Paavonen, T., 2016. Hormonal regulation of immune responses. *Ann. Med.* 26, 255–258.
- Panasevich, M.R., Meers, G.M., Linden, M.A., Booth, F.W., Perfield, J.W. II, Fritsche, K.L., Wankhade, U.D., Chintapalli, S.V., Shankar, K., Ibdah, J.A., Rector, R.S., 2018. High-fat, high-fructose, high-cholesterol feeding causes severe NASH and cecal microbiota dysbiosis in juvenile Ossabaw swine. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 314: E78 –E92.
- Perdigon, G., Fuller, R., Raya, R., 2001. Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 2, 27-42.
- Pires-Lapa, M.A., Tamura, E.K., Salustiano, E.M.A., Markus, R.P., 2013. Melatonin synthesis in human colostrum mononuclear cells enhances dectin-1-mediated phagocytosis by mononuclear cells. *J. Pineal Res.* 55, 240–246.
- Ringø, E., Myklebust, R., Mayhew, T.M., Olsen, R.E., 2007. Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. *Aquaculture.* 268, 251–264.
- Robert, J., Ohta, Y., 2009. Comparative and developmental study of the immune system in *Xenopus*. *Dev. Dyn.* 238, 1249–1270.
- Rettew, J.A., Huet-Hudson, I.M., Marriott, I., 2008. Testosterone reduces macrophage expression in the mouse of toll-like receptor 4, a trigger for inflammation and innate immunity. *Biol. Reprod.* 78, 432–437.
- Roberts, M., Peters, A., 2009. Is testosterone immunosuppressive in a condition-dependent manner? An experimental test in blue tits. *J. Exp. Biol.* 212, 1811–1818.
- Selechnik, D., West, A.J., Brown, G.P., Fanson, K.V., Addison, B., Rollins, L.A., Shine, R., 2017. Effects of invasion history on physiological responses to immune system activation in invasive Australian cane toads. *PeerJ*. doi: 10.7717/peerj.3856

- Singh, A., Singh, R., 2012. Day night variation in phagocytosis and superoxide production by leucocytes in freshwater snake *Natrix piscator*. *The Bioscan* 7, 383-386.
- Spahn, T.W., Kucharzik, T., 2004. Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. *Gut* 53, 456–465.
- Spence, R.A., French, S.S., Hopkins, G.R., Durso, A.M., Hudson, S.B., Smith, G.D., Neuman-Lee, L.A., 2020. Long-term monitoring of two snake species reveals immune–endocrine interactions and the importance of ecological context. *J. Exp. Zool. Part A* 333, 744-755.
- Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X.-N., Koga, Y., 2004. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J. Physiol.* 558, 263–275.
- Szczepanik, M., 2007. Melatonin and its influence on immune system. *J. Physiol. Pharmacol.* 58, 115-124.
- Titon, Jr.B., Titon, S.C.M., Assis, V.R., Barsotti, A.M.G., Vasconcelos-Teixeira, R., Fernandes, P.A.C., Gomes, F.R., 2021. LPS-induced immunomodulation and hormonal variation over time in toads. *J. Exp. Zool. Part A*. doi: 10.1002/jez.2474
- Titon, S.C.M., Assis, V.R., Titon, B.Jr., Cassettari, B.O., Fernandes, P.A.C.M., Gomes, F.R., 2017. Captivity effects on immune response and steroid plasma levels of a Brazilian toad (*Rhinella schneideri*). *J. Exp. Zool.* 327, 127-138.
- Titon, S.C.M., Titon, B.Jr., Assis, V.R., Kinker, G.S., Fernandes, P.A.C.M., Gomes, F.R., 2018. Interplay among steroids, body condition and immunity in response to long-term captivity in toads. *Sci. Rep.* 8, 17168.
- Triantafilou, M., Triantafilou, K., 2002. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol.* 3, 301–304.
- Ulevitch, R.J., Tobias, P.S., 1999. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 19–22.
- Valpotic, H., Terzic, S., Vince, S., Samardzija, M., Turk, R., Lackovic, G., Habrun, B., Djuricic, D., Sadikivic, M., Valpotic, I., 2016. In-feed supplementation of clinoptilolite favourably modulates intestinal and systemic immunity and some production parameters in weaned pigs. *Vet. Med.* 61, 317–327.
- Wang, L., Wang, J., Lu, K., Song, K., Mai, K., Zhang, C., Rahimnejad, S., 2020. Total replacement of fish meal with soybean meal in diets for bullfrog (*Lithobates*

- catesbeianus*): Effects on growth performance and gut microbial composition. *Aquaculture* 524, 735236.
- Wolowczuk, I., Verwaerde, C., Viltart, O., Delanoye, A., Delacre, M., Pot, B., Grangette, C., 2008. Feeding our immune system: impact on metabolism. *Clin. Dev. Immunol.* 2008, 1-19.
- Zhou, J.Y., Zhong, H.J., Yang, C., Yan, J., Wang, H.Y., Jiang, J.X., 2010. Corticosterone exerts immunostimulatory effects on macrophages via endoplasmic reticulum stress. *Brit. J. Surg.* 97, 281–293.
- Zou, J., Bird, S., Cunningham, C., Secombes, C. J., Horton, J., Minter, R., 2000. Molecular cloning of the gene for interleukin-1 β from *Xenopus laevis* and analysis of expression in vivo and in vitro. *Immunogenetics* 51, 332–338.

4.5. Conclusion

In conclusion, ingestion of up to three contaminated meal intakes in a row (live bacteria *A. hydrophila*, 10^9 UFC/ml per meal) do not modulate local and systemic CORT levels, as well as systemic immune innate response such as NL ratio and BKA, in male bullfrogs *L. catesbeianus* at basal physiological conditions (without previous stress and with commensal microbiota). Then, ingestion of contaminated food was not capable to intensify the HPI axis activation and the consequent hormonal and immune response observed in the postprandial period due to feeding in bullfrogs. In this way, contaminated meal ingestion was not able to provoke dysbiosis and activate systemic inflammatory response. However, our results suggest that the ingestion of three contaminated meals in a row tended to decrease CORT stomach levels, possibly contributing to prevent transmigration of the bacteria to organs outside the GIT and to allow local inflammatory and immune responses. Future studies could investigate effects of ingestion of a higher bacterial load, especially on GIT hormonal and immune local parameters, under basal situation and following a stressor stimulus.

Acknowledgments

The work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP 2014/16320 and 2019/24950-4. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)- Finance Code 001.

Funding

The work was supported in part by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP 2014/16320 and 2019/24950-4. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

References

- Ando, T., Brown, R.F., Berg, R.D., Dunn, A.J., 2000. Bacterial translocation can increase plasma corticosterone and brain catecholamine and indoleamine metabolism. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279, R2164–R2172.
- Assis, V.R., Titon, S.C.M., Barsotti, A.M.G., Spira, B., Gomes, F.R., 2013. Antimicrobial capacity of plasma from anurans of the Atlantic Forest. *S. AM. J. Herpetol.* 8, 155–160.
- Assis, V.R., Titon, S.C.M., Barsotti, A.M.G., Titon, Jr.B., Gomes, F.R., 2015. Effects of acute restraint stress, prolonged captivity stress and transdermal corticosterone application on immunocompetence and plasma levels of corticosterone on the Cururu toad (*Rhinella icterica*). *Plos One* 10, 1–21.
- Assis, V.R., Titon, S.C.M., Queiroz-Hazarbassanov, N.G.T., Massoco, C.O., Gomes, F.R., 2017. Corticosterone transdermal application in toads (*Rhinella icterica*): effects on cellular and humoral immunity and steroid plasma levels. *J. Exp. Zool.* 327, 200–213.
- Assis, V.R., Titon, S.C.M., Gomes, F.R., 2019. Acute stress, steroid plasma levels, and innate immunity in Brazilian toads. *Gen. Comp. Endocrinol.* 273, 86–97.
- Auvinen, H.E., Romijn, J.A., Biermasz, N.R., Pijl, H., Havekes, L.M., Smit, J.W., Rensen, P.C., Pereira, A.M., 2012. The effects of high fat diet on the basal activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in mice. *J. Endocrinol.* 214, 191-197.
- Balzan, S., de Almeida Quadros, C., de Cleve, R., Zilberstein, B., Ceconello, I., 2007. Bacterial translocation: Overview of mechanisms and clinical impact. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 22, 464–471.
- Cain, D.W., Cidlowski, J.A., 2017. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 233–247.
- Campbell, T.W., 2006. Hematologia de Anfíbios. In: Trall, M.A. (Eds.), *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. Roca, São Paulo, pp. 291–300.
- Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D.T., Corfe, B.M., Owen, L.J., 2015. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb. Ecol. Health Dis.* 26, 26191.
- Chung, O., Jin, S., Cho, Y.S., Lim, J., Kim, H., Jho, S., Kim, H.-M., Jun, J., Lee, H., Chon, A., Ko, J., et al., 2015. The first whole genome and transcriptome of the cinereous vulture reveals adaptation in the gastric and immune defense systems

- and possible convergent evolution between the Old and New World vultures. *Genome Biol.* 16, 215.
- Cima, I., Corazza, N., Dick, B., Fuhrer, A., Herren, S., Jakob, S., 2004. Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate T cell activation. *J. Exp. Med.* 200, 1635 – 1646 .
- Claësson, D., Abe, A.S., Wang, T., 2015. Autonomic regulation of heart rate during specific dynamic action associated with digestion in the bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Zoologia.* 32, 492-496.
- Coutinho, A.E., Chapman, K.E., 2011. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol. Cell. Endocrinol.* 335, 2-13.
- Crespi, E.J.; Vaudry, H., Denver, R.J., 2004. Roles of Corticotropin-Releasing Factor, Neuropeptide Y and Corticosterone in the Regulation of Food Intake in *Xenopus laevis*. *Journal of Neuroendocrinology.* 16, 279-288.
- Daniel, H., Gholami, A.M., Berry, D., Desmarchelier, C., Hahne, H., Loh, G., Mondot, S., Lepage, P., Rothballer, M., Walker, A., 2014. High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. *ISME J.* 8, 295-308.
- Demisch, L., Demisch, K., Nickelsen, T., 1988. Influence of dexamethasone on nocturnal melatonin production in healthy adult subjects. *J. Pineal Res.* 5, 317-322.
- Dias, D. de C., De Stéfani, M.V., Ferreira, C.M., França, F.M., Ranzani-Paiva, M.J.T., Santos, A.A., 2010. Haematologic and immunologic parameters of bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*, fed probiotics. *Aquaculture Research.* doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02390.x
- Ergang, P., Vagnerová, K., Hermanová, P., Vodicka, M., Jágr, M., Šrutková, D., Dvořáček, V., Hudcovic, T., Pácha, J., 2021. The gut microbiota affects corticosterone production in the murine small intestine. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 4229.
- Fernandes, P.A.C.M., Bothorel, B., Clesse, D., Monteiro, A.W.A., Calgari, C., Raison, S., Simonneaux, V., Markus, R.P., 2009. Local corticosterone infusion enhances nocturnal pineal melatonin production in vivo. *J. Neuroendocrinol.* 21, 90-97.
- Figueiredo, A.C, Titon, S.C.M., Titon Jr, B., Vasconcelos-Teixeira, R., Barsotti, A.M.G., Gomes, F. R., 2021a. Systemic hormonal and immune regulation induced by intraperitoneal LPS injection in bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*). *Comp. Biochem. Physiol. A.* 253, 110872.

- Figueiredo, A.C, Titon, S.C.M., Cyrino, J.C., Nogueira, L.A.K., Gomes, F.R., 2021b. Immune and hormonal modulation in the postprandial period of bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*). *J. Exp. Biol.* 224, 243153.
- Figueiredo, A.C, Nogueira, L.A.K., Titon, S.C.M., Gomes, F.R., Carvalho, J.E., 2022. Immune and hormonal regulation of the *Boa constrictor* (Serpentes; Boidae) in response to feeding. *Comp. Biochem. Physiol. A* 264, 111119.
- Frankiensztajn, L.M, Elliott, E., Koren. O., 2020. The microbiota and the hypothalamus-pituitary-adrenocortical (HPA) axis, implications for anxiety and stress disorders. *Curr. Opin. Neurobiol.* 62, 76–82.
- Gabanyi, I., Muller, P.A., Feighery, L., Oliveira, T.Y., Costa-Pinto, F.A., Mucida, D., 2016. Neuro-immune Interactions Drive Tissue Programming in Intestinal Macrophages. *Cell.* 164, 378–391.
- Galdeano, C.M., Perdigón, G., 2006. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clin. Vaccine Immunol.* 13, 219–226.
- Galley, J.D., Bailey, M.T., 2014. Impact of stressor exposure on the interplay between commensal microbiota and host inflammation. *Gut Microbes.* 5, 390–396.
- Guo, Z., Cui, J., Li, M., Liu, H., Zhang, M., Meng, F., Zhao, Y., 2018. Effect of feeding frequency on growth performance, antioxidant status, immune response and resistance to hypoxia stress challenge on juvenile dolly varden char *Salvelinus malma*. *Aquaculture* 486, 197-201.
- Hansen, K., Sickelmann, F., Pietrowsky, R., Fehm, H.L., Born, J., 1997. Systemic immune changes following meal intake in humans. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 273, R548–R553.
- Hrcir, T., Stepankova, R., Kozakova, H., Hudcovic, T., Tlaskalova-Hogenova, H., 2008. Gut microbiota and lipopolysaccharide content of the diet influence development of regulatory T cells: studies in germ-free mice. *BMC Immunology* 9:65.
- Ibrahim, M.A., Ismail, Z.H., Emeish, F.A.W., Hassan, H.A., 2019. Effects of dietary compound probiotics on the growth performance and innate immune response of Nile Tilapia. *Assiut. Vet. Med. J.* 65, 112-119.
- Kostadinova, F., Schwaderer, J., Sebeo, V., Brunner, T., 2014. Why does the gut synthesize glucocorticoids? *Ann. Med.* 46, 490–497.

- Kirschman, L.J., Milligan-Myhre, K.C., 2018. The costs of living together: Immune responses to the microbiota and chronic gut inflammation. *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/aem.02147-18
- Levy, M., Kolodziejczyk, A., Thaïss, C., Elinav, E., 2017. Dysbiosis and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 219-232.
- Lima, A.S., Ferreira, L.F., Silva, D.P., Gomes, F.R., Titon, S.C.M., 2020. Thermal sensitivity of Bullfrog's immune response kept at different temperatures. *J. Exp. Zool. Part A* 333, 767-778.
- Luoma, R.L., Butler, M.W., Stahlschmidt, Z.R., 2016. Plasticity of immunity in response to eating. *J. Exp. Biol.* 219, 1965-1968.
- Lyte, M., Vulchanova, L., Brown, D.R., 2010. Stress at the intestinal surface: catecholamines and mucosa–bacteria interactions. *Cell Tissue Res.* 343, 23–32.
- Markus, R.P., Fernandes, P.A., Kinker, G.S., da Silveira Cruz-Machado, S., Marçola, M., 2018. Immune-pineal axis–acute inflammatory responses coordinate melatonin synthesis by pinealocytes and phagocytes. *Br. J. Pharmacol.* 175, 3239–3250.
- Meddings, J.B., Swain, M.G., 2000. Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat. *Gastroenterology.* 119, 1019-1028.
- Menezes-Garcia, Z., Do Nascimento Arifa, R.D., Acúrcio, L., Brito, C.B., Gouvea, J.O., Lima, R.L., Souza, D.G., 2020. Colonization by *Enterobacteriaceae* is crucial for acute inflammatory responses in murine small intestine via regulation of corticosterone production. *Gut Microbes* 1–16.
- Mukherji, A., Kobiita, A., Chambon, P., 2013. Homeostasis in intestinal epithelium is orchestrated by circadian clock and microbiota cues transduced by TLRs. *Cell.* 153, 812–827
- Overgaard, J., Andersen, J.B., Wang, T., 2002. The Effects of fasting duration on the metabolic response to feeding in *Python molurus*: an evaluation of the energetic costs associated with gastrointestinal growth and upregulation. *Physiol. Biochem. Zool.* 75, 360–368.
- Panasevich, M.R., Meers, G.M., Linden, M.A., Booth, F.W., Perfield, J.W. II, Fritsche, K.L., Wankhade, U.D., Chintapalli, S.V., Shankar, K., Ibdah, J.A., Rector, R.S., 2018. High-fat, high-fructose, high-ch+olesterol feeding causes severe NASH and

- cecal microbiota dysbiosis in juvenile Ossabaw swine. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 314, E78–E92.
- Ringø, E., Myklebust, R., Mayhew, T.M., Olsen, R.E., 2007. Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. *Aquaculture*. 268, 251–264.
- Sarkar, A., Lehto, S.M., Harty, S., Dinan, T.G., Cryan, J.F., Burnet, P.W.J., 2016. Psychobiotics and the manipulation of bacteria–gut–brain signals. *Trends Neurosci.* 39, 763–781.
- Secor, S.M., 2001. Regulation of digestive performance: a proposed adaptative response. *Comp. Biochem. Physiol.* 128, 565–577.
- Secor, S.M., 2005. Evolutionary and cellular mechanisms regulating intestinal performance of amphibians and reptiles. *Integr. Comp. Biol.* 45, 282–294.
- Secor, S.M., Wooten, J.A., Cox, C.L., 2007. Effects of meal size, meal type, and body temperature on the specific dynamic action of anurans. *J. Comp. Physiol. Part B* 177, 165–182.
- Shu, Q., Gill, H.S., 2002. Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR201) against *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *FEMS Microbiol. Immunol.* 34, 59–64.
- Spahn, T.W., Kucharzik, T., 2004. Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. *Gut*. 53, 456–465.
- Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X.-N., Koga, Y., 2004. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J. Physiol.* 558, 263–275.
- Toledo, L.F., Abe, A.S., Andrade, D.V., 2003. Temperature and meal size effects on the postprandial metabolism and energetics in a boid snake. *Physiol. Biochem. Zool.* 76, 240–246.
- Wang, L., Wang, J., Lu, K., Song, K., Mai, K., Zhang, C., Rahimnejad, S., 2020. Total replacement of fish meal with soybean meal in diets for bullfrog (*Lithobates catesbeianus*): Effects on growth performance and gut microbial composition. *Aquaculture* 524, 735236.
- Wolowczuk, I., Verwaerde, C., Viltart, O., Delanoye, A., Delacre, M., Pot, B., Grangette, C., 2008. Feeding our immune system: impact on metabolism. *Clin. Dev. Immunol.* 2008, 1–19.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação ao estímulo imunológico, podemos concluir que a injeção intraperitoneal de LPS (2 mg/kg) ativa a resposta imune inata sistêmica e modula o perfil hormonal sistêmico de rãs *L. catesbeianus*. Nosso estudo mostrou que o tratamento com LPS aumentou a razão neutrófilo/linfócito e a porcentagem de fagocitose dos leucócitos sanguíneos, assim como diminuiu as concentrações plasmáticas de testosterona e melatonina; e que essas respostas foram mais pronunciadas às 24 h do que às 6 h após o tratamento. Coletivamente, nossos resultados indicam que as respostas inflamatórias decorrentes da injeção intraperitoneal de LPS são montadas a partir de interações entre variáveis imunológicas e hormonais.

Em relação à alimentação, concluímos que tanto rãs *L. catesbeianus* quanto jiboias *B. constrictor* apresentam modulação imune e hormonal durante o período pós-prandial, assim como o jejum modula o perfil hormonal do estômago nas rãs. Nossos resultados indicam ativação aguda do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal/interrenal no início da digestão do alimento nos dois modelos animais, sendo que ambos aumentaram as concentrações de corticosterona plasmática e, conseqüentemente, apresentaram redistribuição de células imunes no sangue após a alimentação. Nesse contexto, o aumento das concentrações de corticosterona plasmática pode ser importante para mobilizar energia necessária para sustentar o incremento metabólico e os processos digestivos, enquanto a redistribuição de células imunes pode contribuir para suprimir potenciais patógenos e injúrias adquiridas durante a captura e digestão de presas.

Já em relação à alimentação contaminada, concluímos que a ingestão de alimento contendo bactérias vivas *A. hydrophila* (10^9 UFC/ml), não é capaz de intensificar a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal e as respostas imunes sistêmicas de rãs *L. catesbeianus* no período pós-prandial. Dessa forma, a ingestão de alimento contaminado (2% da massa corpórea por refeição) não foi capaz de provocar disbiose e ativar uma resposta inflamatória sistêmica. No entanto, nossos resultados sugerem que a ingestão de três refeições contaminadas consecutivas (a cada 48 h) tende a diminuir as concentrações estomacais de corticosterona, possivelmente contribuindo para impedir a transmigração da bactéria para fora do trato gastrointestinal e permitir a montagem de respostas inflamatórias e imunológicas locais.

Anexo 1 – Certificado de aprovação do comitê de ética no uso de animais (CEUA IB/USP)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Sazonalidade, temperatura e presença de microorganismos do alimento na regulação do sistema imune durante o período pós-prandial de rãs (*Lithobates catesbeiana*)**”, registrada com o nº 321/2018, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Fernando Ribeiro Gomes e com a participação dos colaboradores Aymam Cobo de Figueiredo (IB/USP), José Eduardo de Carvalho (UNIFESP/Diadema) e Stefanny Christie Monteiro Titon (IB/USP), que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, em reunião de 21 de agosto de 2018.

Vigência da autorização: 21/08/2018 a 01/08/2021

Finalidade: Pesquisa Científica

Espécie/linhagem: Anfíbio/*Lithobates catesbeiana* (rã-touro-americana)

Nº de animais: 102 (M) **Idade/Peso aprox.:** 1 ano/400g a 600g

Total: 102 animais

Origem: Ranário Santa Clara, Santa Isabel, SP

Adendo 1:

A Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, em 23/11/2020 aprovou a inclusão de 33 anfíbios machos de *Lithobates catesbeiana*, Idade/Peso aprox.: 1 ano/400g a 600g e alteração do “Experimento 2: Efeitos da temperatura, da sazonalidade e do LPS no alimento” para “Experimento 2: Regulação imune e hormonal no período pós-prandial”

1

Adendo 2:

A Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, em 22/09/2021 aprovou a inclusão do experimento 3; prorrogação de prazo para 31/01/2022 e inclusão de 27 Anfíbio/*Lithobates catesbeiana* (rã-touro-americana), Idade/Peso aprox.: 1 ano/400g a 600g,

OBS.: Qualquer intercorrência ou alteração do projeto em andamento deverá ser previamente autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA-IB.



Prof. Dr. Pedro Augusto Carlos Magno Fernandes
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais